

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
**AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS**  
**INSTITUTO BIOLÓGICO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA ALIMENTAR**  
**E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO**

**INTERAÇÕES ENTRE CILEVÍRUS, DICHORHAVÍRUS E PLANTAS**  
**HOSPEDEIRAS**

**LETICIA MARIA FERREIRA**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

SÃO PAULO  
2023

**LETICIA MARIA FERREIRA**

**INTERAÇÕES ENTRE CILEVÍRUS, DICHORHAVÍRUS E PLANTAS  
HOSPEDEIRAS**

Dissertação apresentada para a obtenção do título  
de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e  
Ambiental no Agronegócio

Área de concentração: Segurança Alimentar e  
Sanidade no Agroecossistema

Orientadora:  
Professora Dra. Juliana Freitas-Astúa

Coorientadora:  
Dra. Valdenice Moreira Novelli

SÃO PAULO  
2023

Eu **Leticia Maria Ferreira**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Secretaria de  
Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo Núcleo de  
Informação e Documentação – IB**

---

Ferreira, Leticia Maria.  
Interações entre cilevírus, dichorhavirus e plantas hospedeiras. / Leticia Maria  
Ferreira. - São Paulo, 2023.  
45 p.  
doi: 10.31368/PGSSAAA.2023D.LF01

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-  
Graduação.  
Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.  
Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações  
ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Juliana de Freitas Astúa  
Coorientador: Valdenice Moreira Novelli

Versão do título para o inglês: Interactions between cileviruses, dichorhavirus and host  
plants.

1. Leprose dos citros 2. Pinta verde do caracujazeiro 3. Mancha anular do ca-feeiro 4.  
Vias de defesa de plantas I. Ferreira, Leticia Maria II. Astúa, Juliana de Freitas III.  
Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

*IB/Bibl./2023/01*

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Leticia Maria Ferreira

Título: Interações entre cilevírus, dichorhavirus e plantas hospedeiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Deus, pela vida e propósitos traçados a mim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos (Processo nº 2019/24792-0).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos nos meses iniciais do mestrado (Processo 88887.496010/2020-00).

Ao Instituto Biológico e ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, pela infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

À Dra. Juliana Freitas-Astúa, pela orientação, oportunidade e contribuições para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Dra. Valdenice Moreira Novelli, pela coorientação, ensinamentos e principalmente ao apoio desde o início na vida científica, também contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

Às Dras. Gabriella Dias Arena e Aline Daniele Tassi, pela ajuda e apoio nas etapas desse trabalho.

À Ms. Thaís Elise Sinico, pela amizade, conversas e ajuda durante a condução dos experimentos.

Aos grupos Leprose e VTBs, pela proatividade, contribuições e pela convivência.

À minha família, pelo suporte, amor e apoio, em cada decisão da minha vida.

Obrigada a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho!

## RESUMO

FERREIRA, Leticia Maria. Interações entre cilevírus, dichorhavírus e plantas hospedeiras. 2023. 45 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2023.

*Brevipalpus yothersi* é uma espécie polífaga de ácaro tenuipalpídeo, comumente encontrada em plantas da vegetação espontânea ou cultivadas, associada à transmissão de fitovírus conhecidos como VTBs (vírus transmitidos por *Brevipalpus*). Os VTBs pertencem a dois gêneros, *Cilevirus* e *Dichorhavirus*. Dentre os cilevírus, destacam-se, no Brasil, o citrus leprosis virus C (CiLV-C), principal agente causal da leprose dos citros, que induz danos e perdas significativas à produção de laranja, e o passion fruit green spot virus (PfGSV), agente causal da pinta verde do maracujazeiro, que pode levar à morte prematura da planta. Dentre os dichorhavírus, o coffee ringspot virus (CoRSV), causador da mancha anular do cafeeiro, que ocasiona danos na produção e na qualidade do café, e o clerodendrum chlorotic spot virus (ClCSV), que infecta diversas espécies de plantas ornamentais causando lesões cloróticas a necróticas nas folhas, são frequentemente encontrados no país. Muitos estudos têm tentado esclarecer os mecanismos passivos e ativos de defesa de plantas a patógenos e pragas. Já foi mostrado o envolvimento das vias do ácido salicílico (SA) e jasmonato (JA), além de moléculas reativas de oxigênio (ROS) e morte celular, na resposta de hospedeiras vegetais ao *B. yothersi* e ao CiLV-C. No entanto, não há informação sobre a resposta vegetal a outros VTBs. Assim, este trabalho teve por objetivo principal investigar se a expressão diferencial de genes, observada na interação hospedeira/CiLV-C, é similar em outras interações, independentemente do gênero do vírus inoculado. No geral, os ensaios de avaliação da expressão gênica de *Arabidopsis thaliana* em resposta a ácaros *B. yothersi* indicaram que eles foram responsáveis pela ativação da resposta da via do JA, enquanto genes associados à via do SA, envolvidos na reação de hipersensibilidade (HR) e à via de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR) foram ativados na presença tanto do cilevírus PfGSV quanto na dos dichorhavírus CoRSV e ClCSV. Ensaios de avaliação da expressão gênica de *Nicotiana benthamiana*, em resposta ao CiLV-C e mantidas sob diferentes temperaturas, evidenciaram que a temperatura mais elevada influenciou na resposta vegetal frente ao vírus de forma mais rápida e com maior indução de genes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leprose dos citros. Pinta verde do maracujazeiro. Mancha anular do cafeeiro. Vias de defesa de plantas.

## ABSTRACT

FERREIRA, Leticia Maria. Interactions between cilevirus, dichorhavirus and their host plants. 2023. 45 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2023.

*Brevipalpus yothersi* is the most common tenuipalpid mite vector species in Brazilian orchards and is associated with the transmission of several plant viruses known as BTVs (*Brevipalpus*-transmitted viruses). These BTVs belong to two genera, *Cilevirus* and *Dichorhavirus*. Among the cileviruses, citrus leprosis virus C (CiLV-C) stands out as the main causal agent of citrus leprosis, inducing significant losses to citrus orchards. Another important cilevirus found in Brazil is passion fruit green spot virus (PfGSV), the causal agent of passion fruit green spot, which can lead to premature plant death. Among the dichorhaviruses, there is interest in studying the coffee ringspot virus (CoRSV), which causes damage to coffee production and to the quality of the beverage, and the clerodendrum chlorotic spot virus (ClCSV), which infects several species of ornamental plants, causing chlorotic to necrotic lesions on their leaves. Many studies have tried to unravel passive and active plant defense mechanisms against pathogens and pests. It has been shown that hormonal pathways, such as the salicylic acid and jasmonate, act antagonistically when infested with mites viruliferous for CiLV-C. However, there is no information about the response of plants to other BTVs, regardless of the genus of the virus, and, therefore, the work aims to investigate and compare such responses. Overall, *Arabidopsis thaliana* gene expression evaluation assays in response to *B. yothersi* mites indicated that they were responsible for activating the JA pathway response, while genes associated with the SA pathway, involved in the hypersensitivity reaction (HR) and the misfolded protein response (UPR) pathway were activated in the presence of PfGSV and the dichorhaviruses CoRSV and ClCSV. Gene expression evaluation assays of *Nicotiana benthamiana*, in response to CiLV-C and maintained at different temperatures, showed that the higher temperature influences the plant response to the virus more rapidly and with greater gene induction.

**KEYWORDS:** Citrus leprosis. Passion fruit green spot. Coffee ringspot. Plant defense pathways.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. OBJETIVO GERAL.....	10
2.1. Objetivos específicos.....	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1. Vírus transmitidos por ácaros do gênero <i>Brevipalpus</i> .....	11
3.2. Gênero <i>Cilevirus</i> .....	12
3.3. Gênero <i>Dichorhavirus</i> .....	14
3.4. Mecanismo de defesa das plantas.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. População de <i>Brevipalpus yothersi</i> e manutenção da isolinha 1A .....	17
4.2. Ensaio de transmissão do cilevírus PfGSV e dos dichorhavirus CoRSV e CICSV para <i>A. thaliana</i> por <i>B. yothersi</i> .....	18
4.3. Ensaio de transmissão mecânica dos cilevírus CiLV-C estirpe SJP e PfGSV .....	20
4.4. Extração de RNA vegetal, síntese de cDNA e PCR.....	20
4.5. Avaliação da expressão de genes marcadores de vias de defesa de plantas por RT-qPCR.....	21
4.6. Análise dos dados de RT-qPCR.....	23
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Transmissão de PfGSV, via ácaros virulíferos, para <i>A. thaliana</i> .....	23
5.2. Transmissão de CoRSV, via ácaros virulíferos, para <i>A. thaliana</i> .....	24
5.3. Transmissão de CICSV, via ácaros virulíferos, para <i>A. thaliana</i> .....	25
5.4. Avaliação da expressão de genes da via do SA de <i>A. thaliana</i> , por RT-qPCR, em resposta a PfGSV, CoRSV e CICSV .....	26
5.5. Avaliação da expressão de genes da via do JA de <i>A. thaliana</i> , por RT-qPCR, em resposta a PfGSV, CoRSV e CICSV .....	28
5.6. Avaliação da expressão de genes de <i>A. thaliana</i> associados à HR, por RT-qPCR, em resposta a PfGSV, CoRSV e CICSV.....	29
5.7. Avaliação da expressão de genes da via de UPR de <i>A. thaliana</i> , por RT-qPCR, em resposta a PfGSV, CoRSV e CICSV. ....	31
5.8. Transmissão mecânica de CiLV-C estirpe SJP e PfGSV para <i>N. benthamiana</i> .....	32
5.9. Avaliação da expressão gênica de <i>N. benthamiana</i> , em resposta ao CiLV-C e em diferentes temperaturas .....	34
6. DISCUSSÃO .....	35
7. CONCLUSÃO .....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38



## 1. INTRODUÇÃO

Vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (VTBs) causam doenças não sistêmicas em suas hospedeiras vegetais e são classificados em citoplasmáticos e nucleares, de acordo com o seu sítio de replicação na célula vegetal (KITAJIMA et al., 2003a; TASSI et al., 2017; FREITAS-ASTÚA et al., 2018). Dentre os VTBs do tipo citoplasmático (VTB-C) destacam-se, no Brasil, o citrus leprosis virus C (CiLV-C) e o passion fruit green spot virus (PfGSV) e, dentre os nucleares (VTB-N), o coffee ringspot virus (CoRSV) e o clerodendrum chlorotic spot virus (CICSV). Estes vírus afetam culturas de valor econômico e social para o país, respectivamente citros, maracujá, café e plantas ornamentais (KITAJIMA et al., 2010, 2021; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2018; 2020a). Todos os VTBs permanecem restritos às lesões cloróticas e/ou necróticas induzidas nos pontos de alimentação dos ácaros, não havendo invasão sistêmica dos vírus em suas hospedeiras vegetais em condições de campo (DE LILLO et al., 2021).

O CiLV-C foi o primeiro VTB-C descrito e aceito no gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae*, sendo o agente causal mais comum da leprose dos citros, doença que afeta principalmente laranjeiras doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck). O vírus leva à queda prematura de folhas e frutos, seca de ramos e, em estágio avançado, à morte das plantas (BASTIANEL et al., 2010). Nas últimas cinco safras, a leprose dos citros foi responsável por 5% da queda total de frutos observados em pomares de laranja doce do cinturão citrícola de São Paulo, acarretando, em média, na perda de 3,1 milhões de caixas de frutos e 15,6 milhões de dólares em prejuízos ao produtor (MOREIRA et al., 2022). O PfGSV, patógeno da pinta verde do maracujazeiro, também um cilevírus, induz, como sintomas mais comuns, manchas verdes nos frutos e nas folhas. Nos ramos, as lesões cloróticas tornam-se necróticas e coalescem, podendo causar a morte prematura da planta (KITAJIMA et al., 2003b; ANTONIOLI-LUIZON, 2009).

Os VTB-N pertencem ao gênero *Dichorhavirus*, família *Rhabdoviridae*, e destaque pode ser dado ao CoRSV e ao CICSV. O primeiro é o agente da mancha anular do cafeeiro, causando sintomas de lesões cloróticas em toda a parte aérea da planta e queda prematura de folhas e frutos, com prejuízos na produção dos grãos e depreciação na qualidade do café (KITAJIMA et al., 2011; RAMALHO et al., 2016; GOODIN; FIGUEIRA, 2019). O CICSV, vírus causador da mancha clorótica de *Clerodendrum*, que afeta a espécie ornamental conhecida como lágrima-de-Cristo, induz o aparecimento de lesões cloróticas e necróticas em folhas (KITAJIMA et al., 2008; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2018; TASSI, 2018). Deve-se

ressaltar, no entanto, que em temperaturas elevadas, entre 28 e 30°C, tanto o CoRSV quanto o CICSV são capazes de se tornarem sistêmicos em hospedeiras herbáceas, como *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* e *Tetragonia expansa* (BOARI et al., 2004; KITAJIMA et al., 2008).

Contra herbívoros e patógenos, as plantas ativam vias de defesa (WU; BALDWIN, 2010) através do reconhecimento do agente agressor, formando barreiras físicas e químicas. Essa ativação de resposta de defesa é mediada por vários fitormônios, incluindo ácido jasmônico (do inglês, *jasmonic acid*, JA), envolvido na via de defesa principalmente contra herbívoros mastigadores e patógenos necrotróficos, e ácido salicílico (do inglês, *salicylic acid*, SA), da via de defesa contra agentes que não causam danos expressivos nas células, como herbívoros sugadores e patógenos biotróficos (WU; BALDWIN, 2010; CROY et al., 2021). Logo após esse reconhecimento, espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) são produzidas e acumuladas, podendo culminar em uma resposta de hipersensibilidade (*hypersensitive response*, HR), através de rápida morte celular localizada no local da infecção, para que seja barrada a colonização do patógeno (ZURBRIGGEN et al., 2010). Em alguns casos, quando há grande quantidade de proteínas mal enoveladas no RE, ocorre o estresse do RE e a resposta a proteínas mal enoveladas (UPR) pode não conseguir reverter essa situação, levando à morte celular (LI et al., 2013).

Estudos pioneiros da interação entre *B. yothersi*, CiLV-C e hospedeira vegetal evidenciaram que plantas de *Arabidopsis thaliana* e de laranjeira doce (*Citrus sinensis*) têm as vias de defesa do JA e do SA ativadas quando infestadas com ácaros avirulíferos (ARENA et al., 2016; 2018; 2020). Quando a infestação acontece por ácaros virulíferos, a ativação da via do SA é intensificada, enquanto a do JA é reprimida, em função do antagonismo observado entre as vias (ARENA et al., 2016; 2020). Como a principal via de defesa a herbívoros é a do JA, acredita-se que o ácaro seja favorecido pela presença do CiLV-C e a consequente alteração da resposta vegetal (ARENA et al., 2016).

## **2. OBJETIVO GERAL**

Investigar se o perfil de expressão dos genes encontrados na interação entre *Arabidopsis thaliana*, CiLV-C e *B. yothersi* é válido para diferentes vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus*, envolvidos em outros patossistemas.

### **2.1. Objetivos específicos**

Comparar a expressão de genes que assinalam a ativação das vias do SA, JA,

UPR ou associados à HR em plantas de *A. thaliana* infectadas com diferentes VTBs.

Comparar a resposta biológica e molecular de *N. benthamiana* a CiLV-C e PfGSV, em duas faixas de temperatura (24-25°C e 28-30°C).

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus*

Ácaros do gênero *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) são conhecidos por serem vetores de uma diversidade de fitovírus, comumente conhecidos como VTBs – vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* (KITAJIMA et al., 2003a; TASSI et al., 2017), e colonizam ampla gama de espécies vegetais, algumas de importância econômica e social para o nosso país, como citros, café, maracujá e ornamentais (BASTIANEL et al., 2010; KITAJIMA et al., 2010; RODRIGUES; CHILDERS, 2013; DIETZGEN et al., 2018). Alguns destes vírus podem causar grandes prejuízos econômicos, tornando-se sérias ameaças para as culturas que infectam, pois, a depender do nível de infestação do vetor, podem comprometer toda a produção (BASTIANEL et al., 2010; ANTONIOLI-LUIZON, 2009; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020a; KITAJIMA et al., 2011; RAMALHO et al., 2016). VTBs caracterizam-se por causar doenças não sistêmicas, induzindo o aparecimento de sintomas pontuais caracterizados por lesões cloróticas ou necróticas ao redor do local de alimentação do vetor. Eles são classificados em dois gêneros, *Cilevirus* e *Dichorhavirus*, de acordo com suas características morfológicas e moleculares, além do sítio de replicação na planta hospedeira (FREITAS-ASTÚA et al., 2018). Os cilevírus são considerados citoplasmáticos, ou seja, replicam no citoplasma de células hospedeiras (LOCALI-FABRIS et al., 2012; FREITAS-ASTÚA et al., 2018), enquanto os dichorhavirus são conhecidos como nucleares, pois a replicação ocorre no núcleo das células infectadas (DIETZGEN et al., 2014; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017; FREITAS-ASTÚA et al., 2018).

Sabe-se que há uma peculiar interação entre estes fitovírus e seus vetores. Os cilevírus são transmitidos de modo persistente, sendo detectados entre membranas do intestino do ácaro e com menor tempo de latência (Kitajima; Alberti, 2014; Tassi et al., 2017). Porém, enquanto esses autores sugerem que o vírus apenas circule no interior do vetor, Roy et al. (2015) indicaram que há replicação no ácaro, uma vez que relataram a presença de RNA antigenômico (agRNA) no vetor. No entanto, destaca-se a presença dessas moléculas no interior do ácaro pode decorrer de auto-priming dos iniciadores durante a transcrição reversa do RNA e/ou da detecção de moléculas virais replicativas na planta, adquiridas pelo vetor durante a sua alimentação. A presença de agRNA foi detectada em ácaros que acabavam de se alimentar em

plantas sintomáticas (Tassi et al., dados não publicados), sendo significativamente reduzida – mas não eliminada - quando primers marcados eram usados e quando os ácaros eram mantidos fora das lesões vegetais por vários dias. Esses resultados, somados ao fato de que a relação entre p29sgRNA/RNA1 de CiLV-C em ácaros é significativamente menor do que em plantas (ARENA et al., 2022), levam à hipótese de que o vírus deve replicar, em baixos títulos, em células ainda não identificadas do vetor.

Por outro lado, a transmissão dos dichorhavirus seria do tipo persistente-propagativa, ou seja, com replicação do vírus no vetor, uma vez que se observam não apenas partículas virais, mas grande quantidade de viroplasmias em células do ácaro (KITAJIMA; ALBERTI, 2014; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017; FREITAS-ASTÚA et al., 2018).

### 3.2. Gênero *Cilevirus*

O gênero *Cilevirus* pertence à família *Kitaviridae* e abriga quatro espécies aceitas pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), sendo seus membros o citrus leprosis virus C (CiLV-C), o citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2), o passion fruit green spot virus (PfGSV) e o hibiscus yellow blotch virus (HYBV) (LOCALI-FABRIS et al., 2006; ROY et al., 2014; FREITAS-ASTÚA et al., 2018; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020a, b; OLMEDO-VELARDE et al., 2021). Não há relato do CiLV-C2 no Brasil, sendo o vírus encontrado em citros e em hibisco na Colômbia e também em hibisco nos EUA (MELZER et al., 2013; ROY et al., 2013; 2018). Há, ainda, espécies tentativas do gênero, o *Solanum violifolium* ringspot virus (SvRSV) (FREITAS-ASTÚA et al., 2018), o *Ligustrum chlorotic spot virus* (LigCSV) e *Ligustrum leprosis virus* (LigLV) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2022). Os cilevírus possuem genomas bissegmentados, de fita simples e sentido positivo [ssRNA(+)], e são transmitidos principalmente pela espécie *B. yothersi* (FIGURA 1) (ROY et al., 2014; BEARD et al., 2015; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016, 2020a; TASSI, 2018).



Figura 1 - Ácaro *Brevipalpus yothersi* (Foto: Maria Andréia Nunes, 2018).

Dentre os cilevírus, o que causa maior dano ao Brasil e a diversos países da América Latina é o CiLV-C, principal agente causal da leprose dos citros (FIGURA 2). A doença afeta principalmente os pomares de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), espécie altamente suscetível ao vírus e que exibem sintomas de lesões cloróticas e/ou necróticas em folhas, ramos e frutos, podendo, sem manejo adequado, culminar em desfolha, seca de ramos e morte das plantas (BASTIANEL et al., 2010). Na safra 2021/2022 a queda prematura de frutos, resultante da leprose dos citros, acarretou em 9,5 milhões de caixas perdidas pelo aumento da doença (MOREIRA et al., 2022).



Figura 2 - Sintomas de leprose em folhas (A), frutos (B) e ramos (C) de laranjeira doce (*Citrus sinensis*) (Figura original: BASTIANEL et al., 2010).

Outro cilevírus importante no país é o PfGSV, agente causal da pinta verde do maracujazeiro (FIGURA 3). O patógeno afeta principalmente plantas de maracujá (*Passiflora edulis* Deg. f. *flavicarpa* Sims.), as quais exibem sintomas de manchas verdes nos frutos e nas folhas, enquanto os ramos apresentam inicialmente lesões cloróticas, que se tornam necróticas e culminam na morte prematura da planta (KITAJIMA et al., 2003b; ANTONIOLI-LUIZON, 2009; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020a).

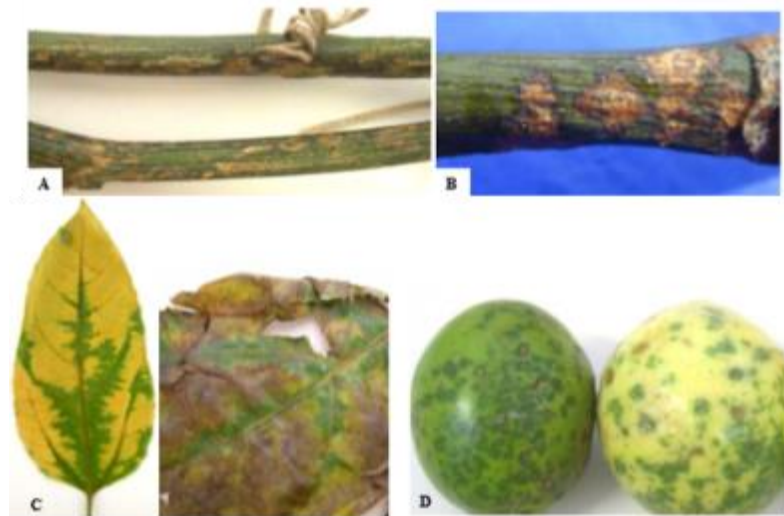


Figura 3 - Sintomas de pinta verde do maracujazeiro em ramos (A, B), folhas (C) e frutos (D) de maracujazeiro (*Passiflora edulis*) (Figura original: ANTONIOLI-LUIZON, 2009).

### 3.3. Gênero *Dichorhavirus*

O gênero *Dichorhavirus* pertence à família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*. Os vírus possuem genoma bissegmentado de fita simples e sentido negativo [ssRNA(-)], distribuídos em cinco espécies aceitas pelo ICTV e recentemente reclassificadas em: *Dichorhavirus coffeae*, *D. citri*, *D. clerodendri*, *D. leprosis* e *D. orchidaceae*. Os vírus associados a essas espécies são, respectivamente, coffee ringspot virus (CoRSV), citrus chlorotic spot virus (CiCSV), clerodendrum chlorotic spot virus (CICSV), citrus leprosis virus N (CiLV-N) e orchid fleck virus (OFV) (DIETZGEN et al., 2014; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017; CHABI-JESUS et al., 2018; FREITAS-ASTÚA et al., 2018; AMARASHINGE et al., 2019; KUHN et al. 2021; ICTV, 2022; KUHN et al., 2022). Dentre os dichorhavirus, o CoRSV é responsável por causar a mancha anular do cafeeiro, que pode gerar danos significativos à cultura do café (*Coffea arabica* L.) (FIGURA 4). Os sintomas de mancha anular do cafeeiro são caracterizados pelo aparecimento de lesões localizadas cloróticas, queda prematura de folhas e frutos, decorrendo em prejuízos na produção dos grãos e depreciação na qualidade do café (KITAJIMA et al., 2011; RAMALHO et al., 2016; GOODIN; FIGUEIRA, 2019).

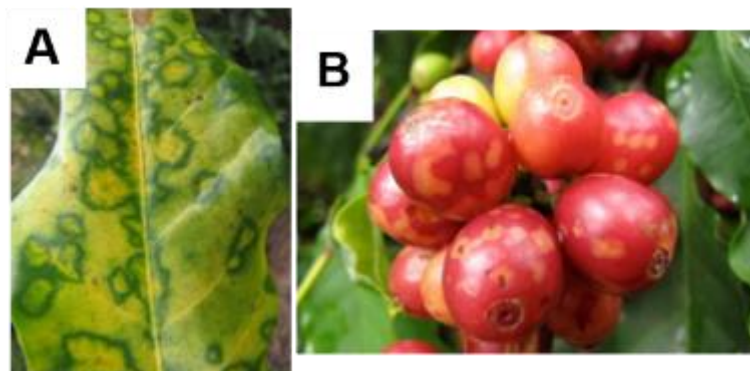


Figura 4 - Sintomas de mancha anular do cafeeiro em folha (A) e frutos (B) de cafeeiro (*Coffea arabica*) (Figura original: RAMALHO et al., 2016).

Outro dichorhavirus importante é o CICSV, agente causal da mancha clorótica do clerodendro, em plantas conhecidas como lágrima-de-Cristo e outras ornamentais, induzindo o aparecimento de lesões cloróticas e necróticas em folhas (FIGURA 5) (KITAJIMA et al., 2008; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2018; TASSI, 2018).



**Figura 5** - Sintomas de mancha clorótica do clerodendro em *Clerodendrum* sp. (Fonte: arquivo pessoal).

De maneira análoga aos cilevírus, os dichorhavirus, incluindo o CoRSV e o CICSV, também não invadem seus hospedeiros sistemicamente em condições naturais. Porém, em temperaturas elevadas (28 - 30°C), eles são capazes de se tornarem sistêmicos em hospedeiras herbáceas, como *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* e *Tetragonia expansa* (BOARI et al., 2004; KITAJIMA et al., 2008).

### 3.4. Mecanismo de defesa das plantas

As plantas apresentam mecanismos de defesa, tais como as barreiras pré-formadas contra artrópodes herbívoros e patógenos (vírus, bactérias, fungos). Porém, quando não suficientes para barrar o ataque dos agentes bióticos, elas podem ativar mecanismos pós-invasivos, tanto a nível basal, nas membranas celulares por reconhecimento dos patógenos, ou dentro das células - via genes de resistência pelo reconhecimento de efetores (WU; BALDWIN, 2010), uma vez que patógenos microbianos adaptados ao hospedeiro exploram estratégias de infecção para evadir ou combater a imunidade da planta e, eventualmente, estabelecer um nicho replicativo (YAN et al., 2022).

Essa resposta de defesa é mediada por fitormônios, como ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA). O SA é um metabólito secundário presente na defesa vegetal contra

herbívoros sugadores e patógenos biotróficos, que não causam tantos danos celulares (WU; BALDWIN, 2010; CROY et al., 2021). Por outro lado, o JA é uma molécula responsável pela defesa vegetal contra herbívoros mastigadores e patógenos necrotróficos, que causam danos mais significativos às células vegetais (WU; BALDWIN, 2010; CROY et al., 2021).

Estudos investigando a resposta de defesa vegetal aos VTBs ainda são incipientes. Os resultados obtidos por Arena et al. (2016, 2018, 2020) evidenciaram que plantas de *Arabidopsis thaliana* e laranja doce (*C. sinensis*) apresentam as vias de defesa do JA e do SA ativadas quando infestadas com ácaros *B. yothersi* avirulíferos. Ainda que a via do SA seja ativada na presença do ácaro devido à alimentação, independentemente da presença do vírus, o CiLV-C intensifica a expressão dos genes da via do SA, suprime a via do JA e induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), favorecendo a colonização do ácaro nessas plantas (ARENA et al., 2016, 2020). Dentre os genes associados à via do SA estão o *ICSI* (*isochorismate synthase 1*), gene envolvido na biossíntese do ácido salicílico e, portanto, ocorre no início da via, o *WRKY70* (*WRKY DNA-binding protein 70*), ativador de genes de defesa dependentes de SA e repressor de genes regulados por JA, e o *PR1* (*pathogenesis-related protein 1*), envolvido na resposta de defesa contra patógenos e principal gene marcador da via. Dentre os genes associados à via do JA, estão o *ORA47* (*octadecanoid-responsive Arabidopsis AP2/ERF47*), envolvido na defesa contra herbívoros, o *PDF1.2* (*plant defensin 1.2*), que codifica a defensina vegetal responsiva ao etileno e ao jasmonato e é o principal marcador da via, e o *VSP2* (*vegetative storage proteins 2*), envolvido na defesa contra herbívoros.

Ademais, a ativação de genes associados à resposta de hipersensibilidade (HR) mostra que a planta induz uma resposta de resistência, corroborando a hipótese de que as lesões causadas pelo CiLV-C sejam resultado de uma interação de incompatibilidade, e não de suscetibilidade (ARENA et al., 2016). Dentre os genes associados a HR estão o *NHL10* (*NDR1/HIN1-like 10*), envolvido na defesa contra o vírus, o *CRK13* (*cysteine-rich RLK 13*), envolvido na morte celular e na indução de defesa contra patógenos, e o *RbohD* (*respiratory burst oxidase homologue D*), envolvido na produção de ROS e na resposta de hipersensibilidade da célula dentro e ao redor do local da infecção (ARENA et al., 2016). Para o dichorhavirus OFV, a indução de proteínas envolvidas na sinalização celular e na síntese de metabólitos secundários sugerem que há uma defesa vegetal coordenada, porém não é claro se essa resposta de defesa é essencial para desaceleração da replicação e disseminação viral (CRUZ-JARAMILLO et al., 2014).

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela que, dentre suas várias funções, é responsável por garantir a estrutura adequada de proteínas da célula (LEÃO, 2013). Sendo



sensível a alterações que afetem a homeostase celular, quando há infecções virais na célula, o RE é utilizado pelos vírus para síntese de proteínas virais e replicação (LEÃO, 2013), podendo levar a alterações na estrutura das proteínas da célula e ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE, chamada de *unfolded protein response* (UPR) (LI et al., 2013). ARENA et al. (2020) identificaram alguns genes da via de UPR induzidos na presença de CiLV-C, mas se essa via é efetiva contra este e outros VTBs não é conhecido. Os genes *bZIP60* (*basic region/leucine zipper motif 60*) e *BIP3* (*binding protein 3*) estão associados à via de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR).

Como *A. thaliana* e *N. benthamiana* são hospedeiras alternativas de diversos cilevírus e dichorhavirus, além do CiLV-C (ARENA et al., 2017; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017; CHABI-JESUS et al., 2018; ARENA et al., 2020), podem ser consideradas plantas modelo interessantes para avaliação e comparação de interação e o padrão de resposta molecular planta-VTBs em outros patossistemas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desvendar, ainda que parcialmente, os mecanismos moleculares de defesa das plantas a VTB-C e VTB-N para que, futuramente, potenciais alvos possam ser utilizados no controle de doenças causadas por esses patógenos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. População de *Brevipalpus yothersi* e manutenção da isolinha 1A

A população de ácaros da isolinha 1A, previamente identificada segundo Beard et al. (2015) como *B. yothersi*, teve seu genoma sequenciado por Navia et al. (2019). Esta população foi multiplicada e mantida sobre folhas destacadas de feijoeiro de porco (*Canavalia ensiformis*) (FIGURA 6) em sala climatizada, sob controle de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa (40 a 70%). Inicialmente, foi feita a transferência dos ácaros de frutos de laranjeira para as folhas de feijoeiro de porco, com auxílio de pincel. Partes das folhas foram pinceladas com uma mistura de farinha de trigo, gesso e água, estratégia para favorecer a multiplicação do ácaro, conforme procedimento descrito em Rodrigues et al. (2007). Posteriormente, quando já estabelecida a população de ácaros nestas folhas, a manutenção seguiu a rotina de encostia das folhas antigas em folhas novas, aproximadamente a cada 15 dias. Destas populações estabelecidas, foram transferidos os ácaros para as plantas hospedeiras (cafeeiro, maracujazeiro e lágrima-de-Cristo), sadias e infectadas por VTBs, previstas no trabalho.

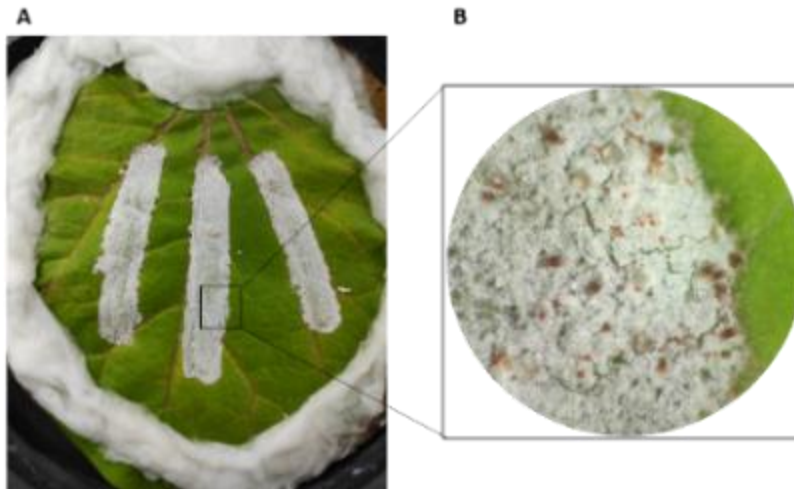


Figura 6 - Ilustração da criação e multiplicação de ácaros *B. yothersi* avirulíferos em folha destacada de feijoeiro de porco (*Canavalia ensiformis*) (A) e colonização na folha de feijoeiro de porco (B) em aumento de 35x, evidenciando a presença de ácaros.

#### 4.2. Ensaio de transmissão do cilevírus PfGSV e dos dichorhavirus CoRSV e CICSV para *A. thaliana* por *B. yothersi*

O inóculo de passion fruit green spot virus (PfGSV) foi obtido de folhas sintomáticas de maracujazeiros, mantidos em casa de vegetação. Para os experimentos de inoculação, ácaros avirulíferos foram transferidos para fontes de inóculo de PfGSV (FIGURA 7) e, após 48 horas, transferidos para folhas de *A. thaliana*, onde permaneceram por período de acesso à inoculação de 2 e 6 dias (DAI), conforme recomendado por Arena (comunicação pessoal).



Figura 7 - Folha de maracujazeiro sintomático para pinta verde do maracujazeiro, utilizada como fonte de inóculo para os experimentos de transmissão do PfGSV.

O inóculo de coffee ringspot virus (CoRSV) utilizado nos experimentos foi proveniente de folhas de cafeeiros mantidos em casa de vegetação, exibindo sintomas de mancha anular do cafeeiro (FIGURA 8). Para os experimentos de transmissão dos

dichorhavirus, os ácaros foram mantidos em inóculo constante, por ser necessário um maior tempo de latência do vírus, no interior do vetor, para que possa ocorrer a transmissão (TASSI et al., 2017). Então, nos experimentos de transmissão de CoRSV, ácaros que estavam em inóculo constante foram transferidos diretamente para as folhas de *A. thaliana* e mantidos por 2 e 6 DAI.



Figura 8 - Folhas de cafeeiros com sintomas de mancha anular do cafeeiro, mantidas em casa de vegetação, usadas como fonte de inóculo para os experimentos.

O inóculo de clerodendrum chlorotic spot virus (CICSV) foi obtido através de folhas sintomáticas (FIGURA 9) da planta ornamental lágrima-de-Cristo, mantidas em casa de vegetação. Para os experimentos de transmissão de CICSV, ácaros que estavam neste inóculo constante foram transferidos para as folhas de *A. thaliana* e mantidos por 2 e 6 DAI.



Figura 9 - Folha de lágrima-de-Cristo com sintomas de mancha clorótica de *Clerodendrum*, mantidas em casa de vegetação, usadas como fonte de inóculo para os experimentos envolvendo o CICSV.

As plantas inoculadas com cada um dos três VTBs foram mantidas em câmara de crescimento (Convion Adaptis 1000), com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25°C (comunicação pessoal).

Foram utilizadas 10 plantas por tratamento e, em cada planta, três folhas foram infestadas com cinco ácaros cada. Os tratamentos foram: (1) ácaros retirados das fontes de inóculo, (2) ácaros provenientes da criação avirulífera e (3) plantas sem infestação por ácaros (controle). Após os períodos de inoculação (2 e 6 dias), as folhas infestadas foram coletadas, maceradas em cadinho de porcelana, com auxílio de pistilo, usando nitrogênio líquido, até obter a consistência de pó, seguindo com o procedimento de extração de RNA total, síntese de cDNA, PCR e RT-qPCR, descritos nos itens 4.4. e 4.5.

#### **4.3. Ensaios de transmissão mecânica dos cilevírus CiLV-C estirpe SJP e PfGSV**

Folhas de citros com lesões de leprose e de maracujazeiro com lesões de pinta verde, causadas por CiLV-C estirpe SJP e PfGSV, respectivamente, foram maceradas em tampão fosfato 0,01M pH 7,0 contendo sulfito de sódio a 0,1%, para formação de uma suspensão de inóculo. Em seguida, folhas jovens de *N. benthamiana* foram polvilhadas com carborundum e a suspensão de inóculo foi friccionada nessas folhas (KITAJIMA et al., 2008). Seis plantas foram mantidas em temperatura ambiente (24-25°C) e outras seis em altas temperaturas (28-30°C). Após 6 dias (início de sintoma em plantas mantidas a 28-30°C) e 12 dias (início de sintoma em plantas mantidas a 24-25°C), as folhas inoculadas foram coletadas (duas folhas por planta, totalizando 12 amostras por faixa de temperatura), maceradas em nitrogênio líquido, seguindo o procedimento de extração de RNA, síntese de cDNA e PCR conforme o item 4.4. O mesmo procedimento foi feito com as plantas controle, usando nas folhas somente o tampão.

#### **4.4. Extração de RNA vegetal, síntese de cDNA e PCR**

As folhas de *A. thaliana* e *N. benthamiana* foram maceradas para extração de RNA total, utilizado RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. Em seguida, foi feita a quantificação do RNA extraído com o equipamento NanoDrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) para padronizar a quantidade de RNA utilizada, e o tratamento das amostras com o kit DNase I, Rnase-free (Thermo Fisher Scientific), seguindo protocolo do fabricante. Após o tratamento com a Dnase I, foi realizada novamente a quantificação do RNA, para em seguida ser feita a síntese de cDNA, utilizando kit comercial iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD), de acordo com as instruções do fabricante.

PCRs foram realizadas para a confirmação da presença dos VTBs. As reações foram feitas com GoTaq® Master Mix (Promega), compostas por 6,5 µL de GoTaq®, 0,2 µL de primers específicos para cada vírus (10 mM) (TABELA 1), 10 ng de cDNA e água estéril para completar o volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram de 94°C por 3 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54 -56° C por 30 segundos e 72° C por 40 segundos, com extensão final de 72° C por 5 minutos. A temperatura de anelamento de 54° C foi utilizada para a detecção de PfGSV e CiLV-C, de 55° C para CoRSV e de 56° C para CICSV.

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose (1%), corados com brometo de etídeo (0,5%) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) em fotodocumentador.

Tabela 1 - Sequência e tamanho dos fragmentos específicos para cada vírus inoculado em plantas hospedeiras experimentais.

VTB*	Iniciador (5' – 3')	Tamanho (pb)	Referência
CoRSV	F: GGACCATGAGACAGGAGGTG R: CTCTGCCAGTCCTCAATGTG	389	Kitajima et al. (2011)
CICSV	F: AGTGTACCGCCTCACAGAAG R: CGGGGTCTTGTGTTCATAG	219	Kubo et al. (2011)
PfGSV	F: AATCTAGCTCAAAACCCACA R: ATCTCCTGATCTACGCTGAA	443	Ramos-González et al. (2020a)
CiLV-C	F: CTCATGATATCCTTGATGACC R: CAACCTTCTCAACCTTATTAGTC	393	Chabi-Jesus et al. (2021)

\*(CoRSV): coffee ringspot virus; (CICSV): clerodendrum chlorotic spot virus; (PfGSV): passion fruit green spot virus; (CiLV-C): citrus leprosis virus C.

#### 4.5. Avaliação da expressão de genes marcadores de vias de defesa de plantas por RT-qPCR

As análises de expressão gênica das plantas foram realizadas via RT-qPCR e processadas em duplicata, usando equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies). Foram utilizados 6,5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), em volume final de 12 µL, adicionando 5 mM de cada par de iniciadores específicos (TABELA 2), 3 µL do cDNA (1 ng/µL), e água estéril para completar o volume. Os genes *F-BOX* e *SAND* foram utilizados como normalizadores da reação para *A. thaliana*, conforme descrito em Arena et al. (2016) e o gene *ACT* como normalizador da reação para *N. benthamiana* (Liu et al., 2012).

Tabela 2 - Genes marcadores de vias de resposta de defesa de *A. thaliana* e *N. benthamiana* a agentes bióticos avaliados quanto à sua expressão por RT-qPCR em resposta a VTBs, ácaros *B. yothersi* e tampão de inoculação.

Via de defesa*	Gene	Sequência dos iniciadores (5' - 3')	Referência
Genes de referência	<i>F-BOX</i>	F:GGCTGAGAGGTTTCGAGTGTT R:GGCTGTTGCATGACTGAAGA	LILLY et al. (2011)
	<i>SAND</i>	F: AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT R: TGATTGCATATCTTTATCGCCATC	CZECHOWSKI et al. (2005)
	<i>ACT</i>	F: TCCTGATGGGCAAGTGATTAC R: TTGTATGTGGTCTCGTGGATTC	LIU et al. (2012)
SA	<i>ICS1</i>	F: GAGACTTACGAAGGAAGATGATGAG R: TGATCCCGACTGCAAATTCACTCTC	CHEN et al. (2009)
	<i>PR1</i>	F: GTGCCAAAGTGAGGTGTAACAA R: CGTGTGTATGCATGATCACATC	LINDERMAYR et al. (2010)
	<i>WRKY70</i>	F: GGAAGAAGACAATCCTCATCGT R: CGTTTTCCATTGACGTAAC	VON SAINT PAUL et al. (2011)
	<i>PR1</i>	F: GTGCCAAAATTCTCAACA R: AAATCGCCACTTCCCTCAG	MOON et al. (2016)
	<i>PR2</i>	F: TTTGATGCCCTTTTGGATTC R: CTGCCCCGCTTTTCACAT	LI et al. (2018)
JA	<i>ORA47</i>	F: TCCACCGTCGATCTCCGTAGAAAA R: GCGAATCTAGCAGCAGCTTCCTGA	HICKMAN et al. (2017)
	<i>PDF1.2</i>	F: CTTGTTCTCTTTGCTGCTTTCGAC R: TTGGCTCCTTCAAGGTTAATGCAC	LÓPEZ et al. (2011)
	<i>VSP2</i>	F: ACGCAAAATATGGATACGGAACAG R: CGGTCCCTAACCACAACCAGTA	BISCHOFF et al. (2009)
HR	<i>CRK13</i>	F: GGGACAAGAAGAGAGACAATAGTAG R: CCGAGATGATGATGAGGATGAC	Este trabalho
	<i>NHL10</i>	F: TTCCTGTCCGTAACCCAAAC R: CCCTCGTAGTAGGCATGAGC	BOUDSOCQ et al. (2010)
	<i>RbohD</i>	F: CTAGCTTTGGATTTTTCTCGA R: GTAACCAACAAAACGGTAGGG	LI et al. (2012)
	<i>HiN1</i>	F: TTCCGCCACCAGCAAAATC R: TTAGGACGAAGAACGAGCCATA	LI et al. (2018)
UPR	<i>bZIP60</i>	F: CGATGATGCTGTGGCTAAAA R: TCTCAAGCATTCTTTTCGAGAT	IWATA et al. (2008)

<i>BIP3</i>	F: CACGGTTCAGCGTATTTCAAT R: ATAAGCTATGGCAGCACCCGTT	BLANCO-HERRERA et al. (2015)
<i>bZIP60</i>	F: AATCAACGAAGCAGAAACCACG R: TGCCCATCATTAAGGACAGGAA	MOON et al. (2016)
<i>CRT</i>	F: TGCTCGTCGCTGTCGTCTCC R:GCGTCTCCATTCCACTTGCC	LI et al. (2018)

---

\*SA: ácido salicílico; JA: ácido jasmônico; HR: reação de hipersensibilidade; UPR: resposta a proteínas mal enoveladas.

#### 4.6. Análise dos dados de RT-qPCR

A quantificação dos valores de Cq e a análise da eficiência dos primers na amplificação dos genes avaliados por RT-qPCR foram realizadas usando o algoritmo Real-Time PCR Miner (ZHAO; FERNALD, 2005). As amostras vegetais foram selecionadas da seguinte maneira: S/A – amostras controle, sem infestação com ácaros ou presença de vírus; AV – amostras infestadas com ácaros avirulíferos que, confirmadamente, se alimentaram do tecido vegetal -comprovado pela indução do gene marcador da via de JA PDF1.2; VIR – amostras infestadas com ácaros virulíferos, confirmadamente positivos para cada um dos vírus testados em cada ensaio. As análises de expressão dos genes foram realizadas de acordo com o modelo 1Cq utilizando os genes de referência citados no item 4.5. O valor de Cq de cada amostra (média das duas repetições técnicas) foi convertido em quantidades relativas (RQ) usando a função  $RQ = E^{1Cq}$ , onde 1Cq é a diferença entre o menor valor Cq em todas as amostras e o valor Cq de uma determinada amostra (ZHAO; FERNALD, 2005). Para analisar os dados gerados pelo software Real-Time PCR Miner, devido à alta variação de expressão dos genes encontrada dentro de um mesmo tratamento, foi realizado teste de normalidade entre as amostras. Como as amostras não apresentaram distribuição normal, foi realizada análise estatística não paramétrica, através do teste de Dunn's, após a análise e descarte de outliers com padrão  $>0,05$  (recomendado pelo programa de estatística GraphPad).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Transmissão de PfGSV, via ácaros virulíferos, para *A. thaliana*

A confirmação da inoculação do PfGSV em plantas de *A. thaliana*, se deu por PCR, após o período de 2 e 6 DAI, tendo sido avaliados os três tratamentos para cada tempo: 1) plantas infestadas com ácaros avirulíferos (AV), 2) plantas infestadas com ácaros virulíferos (VIR) e 3) plantas controle, sem infestação com ácaros (S/A). Conforme esperado, não houve

amplificação de fragmento específico de PfGSV nas amostras de plantas sem ácaros (FIGURAS 10 A/D) ou infestadas com ácaros avirulíferos (FIGURAS 10 B/E). Foi confirmada a presença de vírus somente nas plantas infestadas com ácaros virulíferos (FIGURAS 10 C/F).

Somente plantas positivas para o PfGSV foram utilizadas para os experimentos de expressão gênica, num total de 100% das plantas infestadas com ácaros virulíferos aos 2 DAI e 90% aos 6 DAI (FIGURAS 10 C/F).

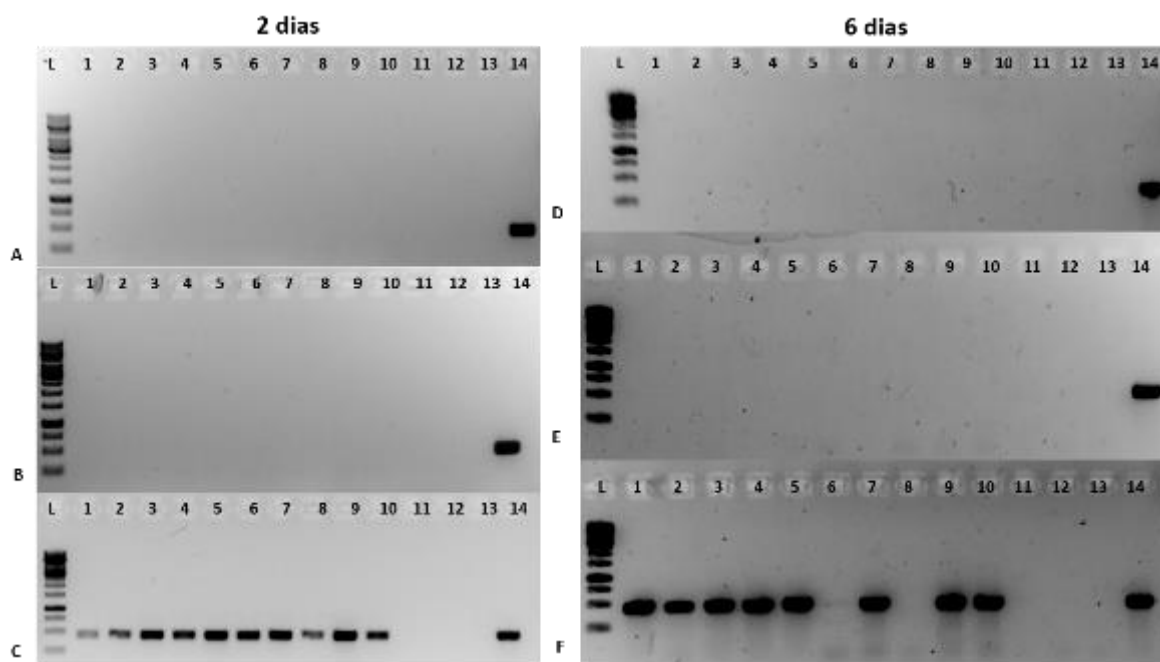


Figura 10 - Gel de agarose a 1% evidenciando o produto da amplificação por PCR para a detecção de PfGSV em folhas de *A. thaliana*, em experimento após 2 e 6 DAI: (A) folhas de *A. thaliana* sem ácaros (1 a 10); (B) folhas de *A. thaliana* infestadas com ácaros AV (1 a 10); (C) folhas de *A. thaliana* infestadas com ácaros VIR (1 a 10). Controle negativo da extração de RNA (planta sadia = 11), controle negativo cDNA (12), controle negativo PCR (13), controle positivo PCR (planta sintomática= 14), (L) Marcador de peso molecular 1 kb (Thermo Scientific – SM0311). Amplicon PfGSV: 443 pb, AV = avirulífero, VIR = virulífero.

## 5.2. Transmissão de CoRSV, via ácaros virulíferos, para *A. thaliana*

De maneira análoga ao item 5.1., a detecção molecular do CoRSV em plantas submetidas aos diferentes tratamentos só foi possível naquelas infestadas com ácaros virulíferos (FIGURAS 11 C/F), totalizando 100% das plantas infestadas aos 2 e 6 DAI. Plantas não infestadas (FIGURAS 11 A/D) ou infestadas com ácaros avirulíferos (FIGURAS 11 B/E) não resultaram em amplificação de fragmento específico do CoRSV.



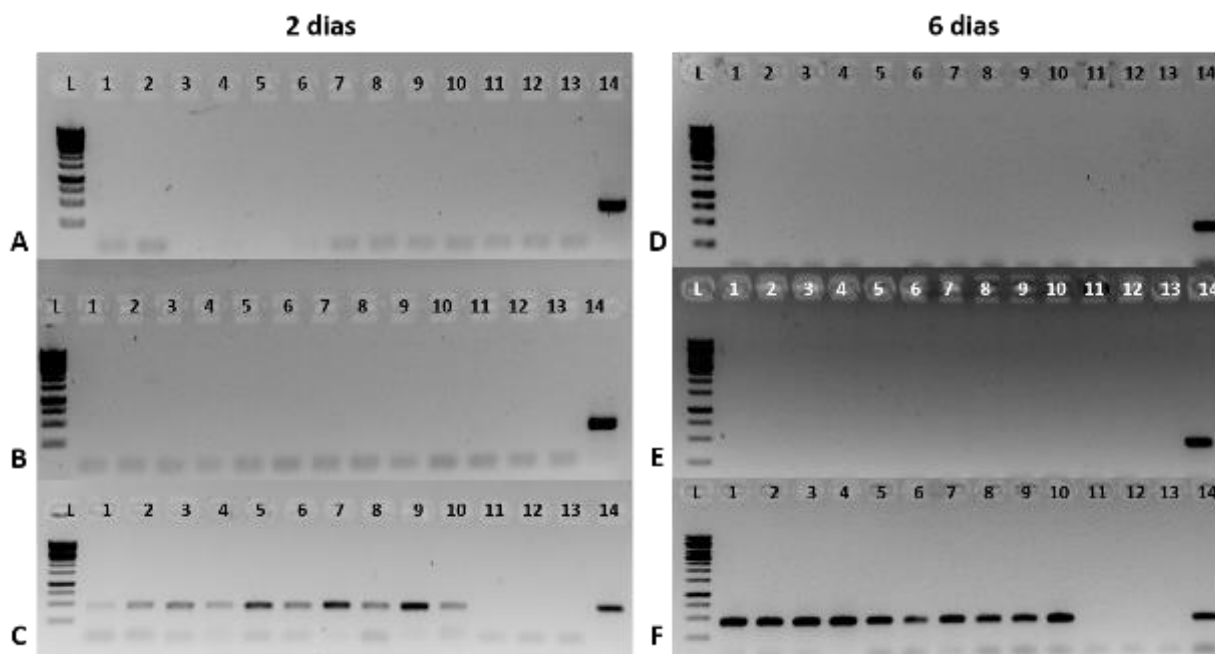


Figura 11 - - Gel de agarose a 1% evidenciando o produto da amplificação por PCR para a detecção de CoRSV em folhas de *A. thaliana*, em experimento de 2 dias e 6 DAI: (A e D) folhas de *A. thaliana* sem ácaros (1 a 10); (B e E) folhas de *A. thaliana* infestadas com ácaros AV (1 a 10); (C e F) folhas de *A. thaliana* infestadas com ácaros VIR (1 a 10). Controle negativo da extração de RNA (planta sadia = 11), controle negativo cDNA (12), controle negativo PCR (13), controle positivo PCR (planta sintomática= 14), (L) Marcador de peso molecular 1 kb (Thermo Scientific – SM0311). Amplicon CoRSV: 389 pb, AV = avirulífero, VIR = virulífero.

### 5.3. Transmissão de CICSV, via ácaros virulíferos, para *A. thaliana*

Também o CICSV só foi detectado, por PCR, em plantas infestadas com ácaros virulíferos (FIGURAS 12 C/F). Conforme esperado, plantas sem ácaros (FIGURAS 12 A/D) ou infestadas com ácaros avirulíferos (FIGURAS 12 B/E) permaneceram livres do vírus.

Somente as amostras positivas para CICSV foram utilizadas nos experimentos de expressão gênica, totalizando 4 plantas aos 2 DAI e 10 plantas aos 6 DAI (FIGURAS 12 C/F).

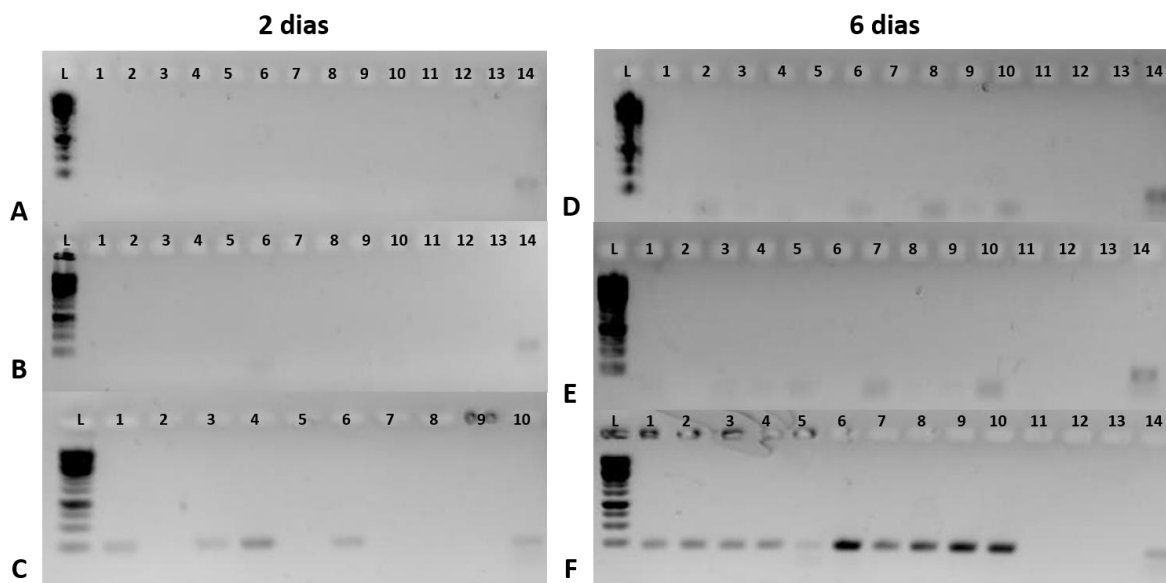


Figura 12 - Gel de agarose a 1% evidenciando o produto da amplificação por PCR para a detecção de CICSV em folhas de *A. thaliana*, em experimento após 2 e 6 DAI: (A e D) folhas de *A. thaliana* sem ácaros (1 a 10); (B e E) folhas de *A. thaliana* infestadas com ácaros AV (1 a 10); (F) folhas de *A. thaliana* infestadas com ácaros VIR (1 a 10). Controle negativo da extração de RNA (planta sadia = 11), controle negativo cDNA (12), controle negativo PCR (13), controle positivo PCR (planta sintomática= 14). (C) folhas de *A. thaliana* infestadas com ácaros VIR (1 a 6). Controle negativo da extração de RNA (planta sadia = 7), controle negativo cDNA (8), controle negativo PCR (9), controle positivo PCR (planta sintomática= 10). (L) Marcador de peso molecular 1 kb (Thermo Scientific – SM0311). Amplicon CICSV: 219 pb, AV = avirulífero, VIR = virulífero.

#### 5.4. Avaliação da expressão de genes da via do SA de *A. thaliana*, por RT-qPCR, em resposta a PfGSV, CoRSV e CICSV

A expressão de três genes da via do SA foi avaliada em plantas de *A. thaliana* em resposta à infestação com ácaros AV ou com ácaros VIR para o cilevírus PfGSV (ensaio 1) e para os dichorhavirus CoRSV e CICSV (ensaios 2 e 3), aos 2 e 6 DAI (FIGURAS 13 A/B/C). O tratamento controle foi composto por plantas sem infestação de ácaros (S/A).

Analisando a resposta de *A. thaliana* do ensaio 1, envolvendo o cilevírus PfGSV (FIGURA 13A), foi possível observar que a expressão do gene *ICS1* se manteve estável em todos os tratamentos, com ou sem a infestação das plantas com ácaros, virulíferos ou não (FIGURA 13A). Resultado similar foi obtido em resposta ao dichorhavirus CICSV, no ensaio 3 (FIGURA 13C), sendo que apenas para o CoRSV (ensaio 2) foi detectada a repressão desse gene em plantas do tratamento AV, quando comparadas ao tratamento controle, e sua indução em plantas VIR, aos 2 DAI, quando comparadas ao tratamento AV (FIGURA 13B). Portanto, no geral, observou-se uma estabilidade na expressão do gene *ICS1* em resposta a VTB, aos 2 e 6 DAI (FIGURA 13). De maneira análoga ao observado para o gene *ICS1*, no geral, a expressão do gene *WRKY70*, manteve-se estável em resposta aos três vírus nos dois tempos avaliados (FIGURA 13). Apenas quando plantas de *Arabidopsis* foram infestadas com ácaros AV, no

ensaio 1, observou-se a repressão deste gene quando comparado ao tratamento S/A, aos 2 DAI (FIGURA 13A).

No entanto, apesar da estabilidade dos genes mais iniciais e intermediários da via, a expressão do gene *PR1*, o principal marcador da via de SA, foi significativamente induzida em plantas infestadas com ácaros VIR para o CoRSV em relação a plantas AV, aos 2 DAI (FIGURA 13 B), com tendência de indução para PfGSV, aos 6 DAI, e para CICSV, aos 2 DAI (FIGURA 13 A/C). Quando se comparou a expressão do gene *PR1* entre os tratamentos VIR e S/A nos dois tempos e nos três ensaios realizados, observou-se significativa indução da expressão do gene em todos os casos, com exceção do ensaio 3, aos 6 DAI (FIGURA 13).

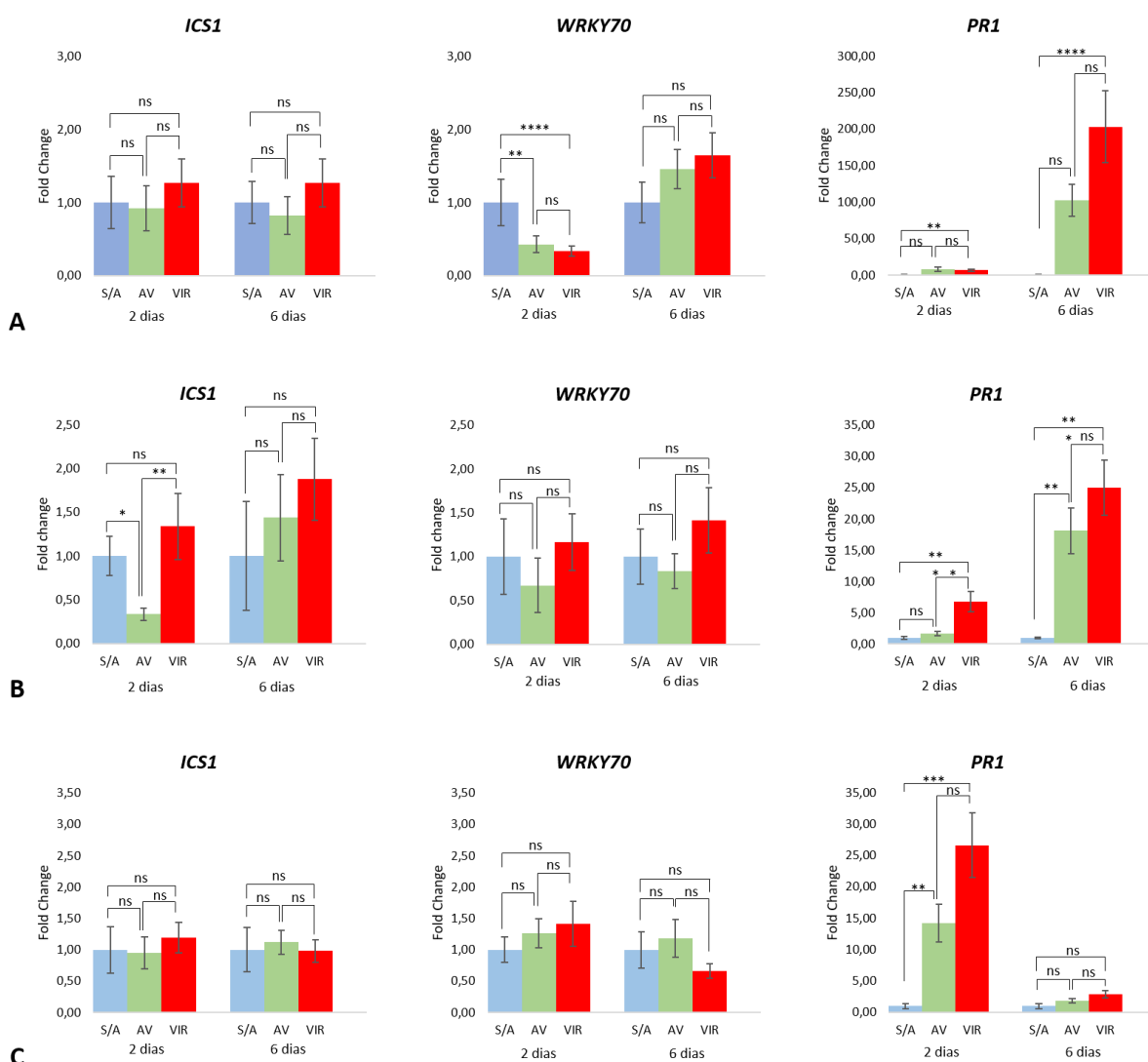


Figura 13 - Perfil de expressão dos genes *ICS1*, *WRKY70* e *PR1* da via do ácido salicílico (SA) de *A. thaliana* em resposta ao (A) PfGSV, (B) CoRSV e (C) CICSV, em experimentos com tempo de acesso à inoculação de 2 e 6 dias. (S/A): plantas sem ácaros, (AV): plantas infestadas com ácaros avirulíferos e (VIR): plantas infestadas com ácaros virulíferos. Teste de Dunn's: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*  $p < 0,00005$  e ns - não significativo.

### 5.5. Avaliação da expressão de genes da via do JA de *A. thaliana*, por RT-qPCR, em resposta a PfGSV, CoRSV e CICSV

Em geral, o gene *ORA47*, envolvido na defesa contra estresses bióticos e abióticos e pertencente à via do JA, teve sua expressão induzida aos 2 e 6 DAI, em resposta a ácaros AV no ensaio 3 (CICSV) quando comparado ao tratamento S/A. Foi observada também diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos VIR e S/A nesse ensaio, aos 2 DAI (FIGURA 14 C). Apesar de não apresentar diferença significativa, houve uma clara tendência de indução da expressão do gene *ORA47* em plantas infestadas com ácaros AV, quando comparadas com S/A, no ensaio 2 (CoRSV), aos 6 DAI. A indução na expressão desse gene também foi observada no mesmo tempo de avaliação em plantas infestadas com ácaros AV quando comparadas com plantas VIR (FIGURA 14 B). No ensaio 1 (PfGSV), o gene foi induzido pela presença de ácaros virulíferos aos 6 DAI (FIGURA 14).

O gene *VSP2* foi induzido na presença de ácaros AV em comparação com o tratamento S/A (FIGURA 14) nas três situações analisadas. No entanto, para o ensaio associado ao cilevírus PfGSV, essa resposta se deu aos 6 DAI (FIGURA 14 A), enquanto para os ensaios associados aos dichoravírus, a expressão desse gene foi claramente induzida aos 2 DAI (FIGURAS 14 B/C). A expressão do gene *VSP2* foi induzida também na presença do cilevírus PfGSV e do dichorhavírus CoRSV, em comparação com os tratamentos S/A correspondentes, aos 6 DAI (FIGURA 14 A/B).

O marcador da via, o gene *PDF1.2*, foi, como esperado, o mais informativo da resposta de *A. thaliana* aos VTBs. Consistentemente, tanto aos 2 DAI quanto aos 6 DAI, a expressão desse gene foi induzida em resposta ao ácaro *B. yothersi* nos três tratamentos (FIGURA 14) e reprimida em plantas infectadas com os dichorhavírus aos 2 DAI (FIGURA 14 B/C). Em geral, os genes analisados, principalmente o *PDF 1.2*, mostraram que a via do JA é induzida nas plantas em resposta à presença do ácaro, quando comparada ao tratamento controle S/A, e reprimida na presença dos vírus, quando comparadas com plantas AV (FIGURA 14).

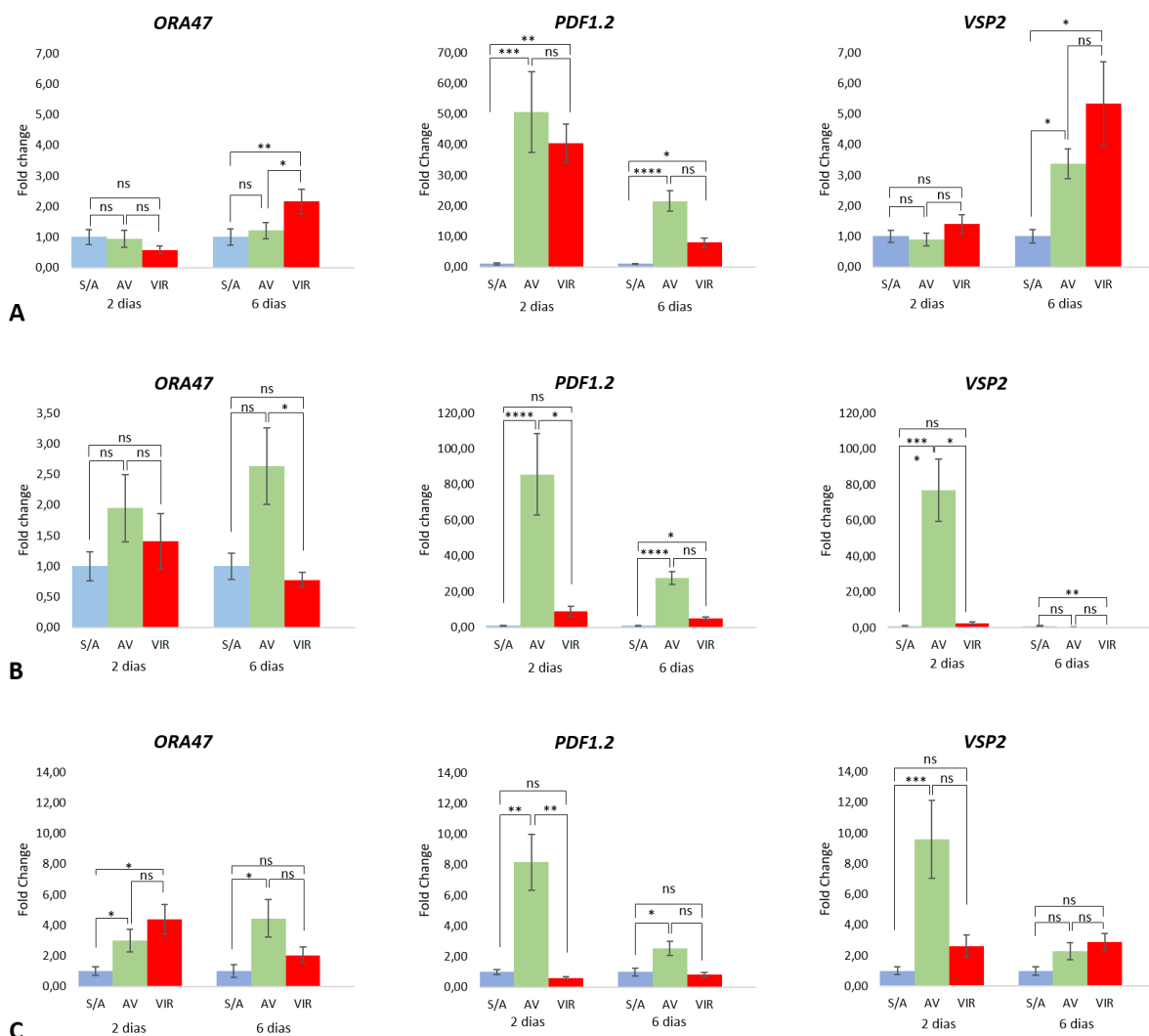


Figura 14 - Perfil de expressão dos genes *ORA47*, *PDF1.2* e *VSP2* da via do ácido jasmônico (JA) de *A. thaliana* em resposta ao (A) PfGSV, (B) CoRSV e (C) CICSV, em experimentos com tempo de acesso à inoculação de 2 e 6 dias. (S/A): plantas sem ácaros, (AV): plantas infestadas com ácaros avirulíferos e (VIR): plantas infestadas com ácaros virulíferos. Teste de Dunn's: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*  $p < 0,00005$  e ns - não significativo.

## 5.6. Avaliação da expressão de genes de *A. thaliana* associados à HR, por RT-qPCR, em resposta a PfGSV, CoRSV e CICSV.

Os três genes avaliados, associados à HR, apresentaram expressão diferencial quando submetidos aos diferentes tratamentos. Enquanto o gene *CRK13* foi induzido em resposta ao cilevírus PfGSV apenas aos 6 DAI, a resposta aos dichorhavirus CoRSV e CICSV foi mais rápida, com diferenças estatísticas observadas já aos 2 DAI, quando comparados com o tratamento S/A (FIGURAS 15 A/B/C). Interessante notar que tanto no ensaio 1 (PfGSV) quanto no 2 (CoRSV), a diferença na expressão desse gene foi observada também entre o tratamento VIR e AV (FIGURA 15 A/B).

A expressão do gene *NHL10* foi induzida em plantas infestadas com ácaros AV,

em comparação ao tratamento controle, aos 6 DAI para o ensaio com PfGSV, e aos 2 e 6 DAI para os ensaios com CICSV (FIGURA 15 A/C). Resultados similares foram observados quando as comparações foram feitas entre tratamentos VIR e S/A (FIGURA 15 A/B/C), sugerindo um importante papel do ácaro e, no caso do ensaio 2 (CoRSV), do vírus, na expressão desse gene. Apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa, houve uma clara tendência de indução na expressão desse gene, aos 6 DAI, para plantas infectadas com PfGSV e CoRSV, quando comparadas ao tratamento AV (FIGURAS 15 A/B).

Já a expressão do gene *RbohD* se manteve mais estável nas situações avaliadas, apresentando indução em relação ao controle S/A apenas quando as plantas foram infestadas com ácaros (sejam eles AV ou VIR), no ensaio 1 (PfGSV) aos 6 DAI, ou repressão em plantas virulíferas para CICSV, aos 2 DAI, quando comparadas ao tratamento AV (FIGURA 15 A/C).

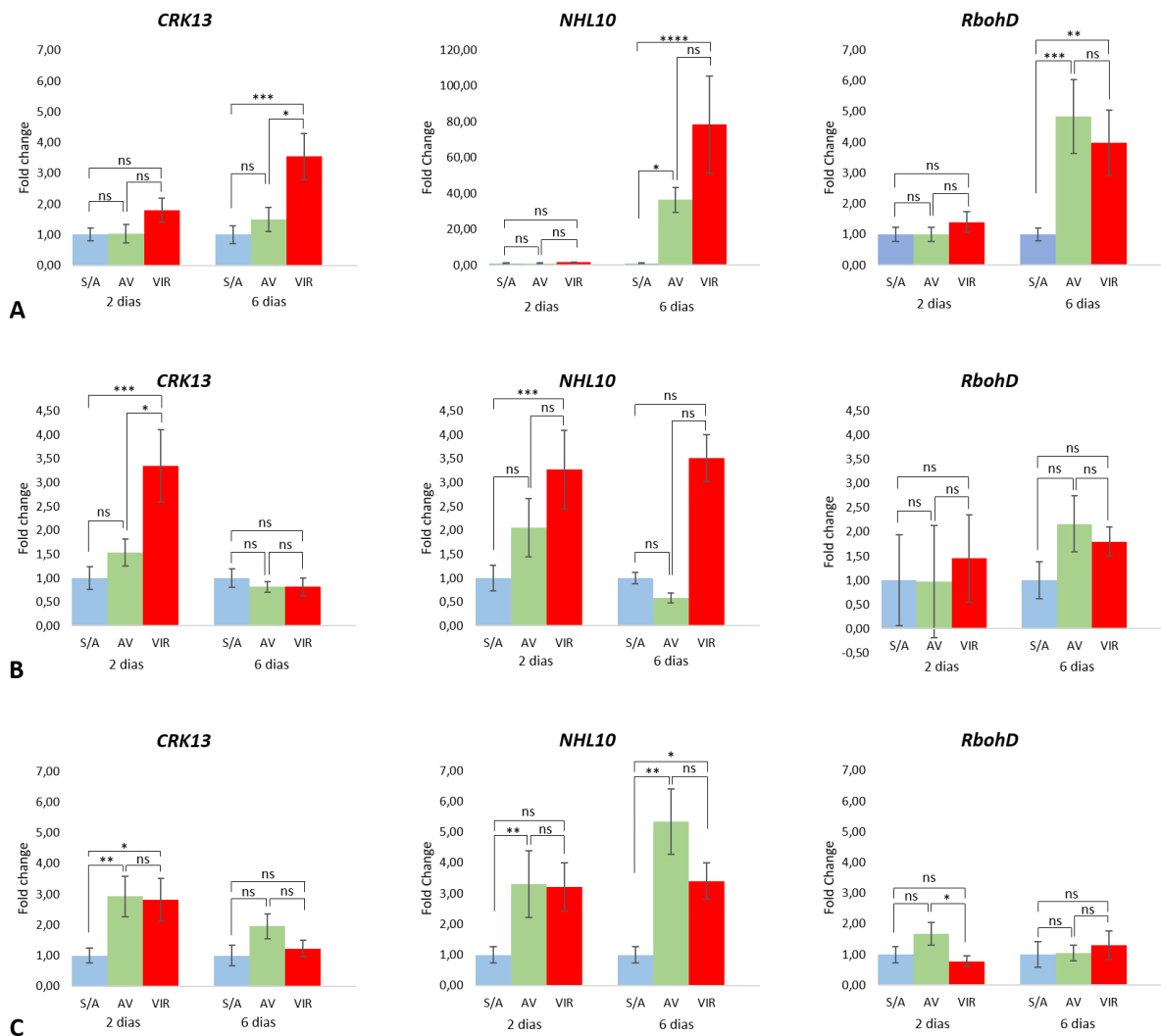


Figura 15 - Perfil de expressão dos genes *CRK13*, *NHL10* e *RbohD* de reação de hipersensibilidade (HR) de *A. thaliana* em resposta ao (A) PfGSV, (B) CoRSV e (C) CICSV, em experimentos com tempo de acesso à inoculação de 2 e 6 dias. (S/A): plantas sem ácaros, (AV): plantas infestadas com ácaros avirulíferos e (VIR): plantas

infestadas com ácaros virulíferos. Teste de Dunn's: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*  $p < 0,00005$  e ns - não significativo.

### **5.7. Avaliação da expressão de genes da via de UPR de *A. thaliana*, por RT-qPCR, em resposta a PfGSV, CoRSV e CICSV.**

A expressão de dois genes associados à via de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR), *bZIP60* (*basic region/leucine zipper motif 60*) e *BIP3* (*binding protein 3*), foi avaliada e comparada nos diferentes tratamentos. No geral, os valores de expressão (fold change) foram pouco alterados ao longo do tempo após a infestação e em função dos tratamentos (FIGURA 16). Ainda assim, o gene *bZIP60* foi induzido na presença de PfGSV, aos 6 DAI, em comparação com o tratamento AV (FIGURA 16 A). Ainda que o mesmo não tenha sido observado em resposta aos dichorhavirus, foi possível notar uma tendência de indução do gene quando as plantas foram infestadas com ácaros virulíferos para CoRSV, aos 2 DAI, quando comparadas aos tratamentos AV e S/A (FIGURAS 16 B).

A expressão do gene *BIP3* foi reprimida na presença de ácaros AV quando comparada com o tratamento S/A aos 2 DAI nos ensaios 1 (PfGSV) e 2 (CoRSV). A repressão desse gene no tratamento AV também foi observada com relação ao tratamento VIR aos 6 DAI no ensaio 1 e aos 2 DAI no ensaio 2 (FIGURA 16 A/B). Já para o ensaio 3 (CICSV), a expressão do gene *BIP3* foi induzida pela infestação de ácaros VIR quando comparada com o tratamento S/A em ambos os tempos avaliados (FIGURA 16 C).

Em geral, a via de UPR foi ativada na presença de dichorhavirus, aos 2 DAI, e ao cilevírus, aos 6 DAI (FIGURA 16).

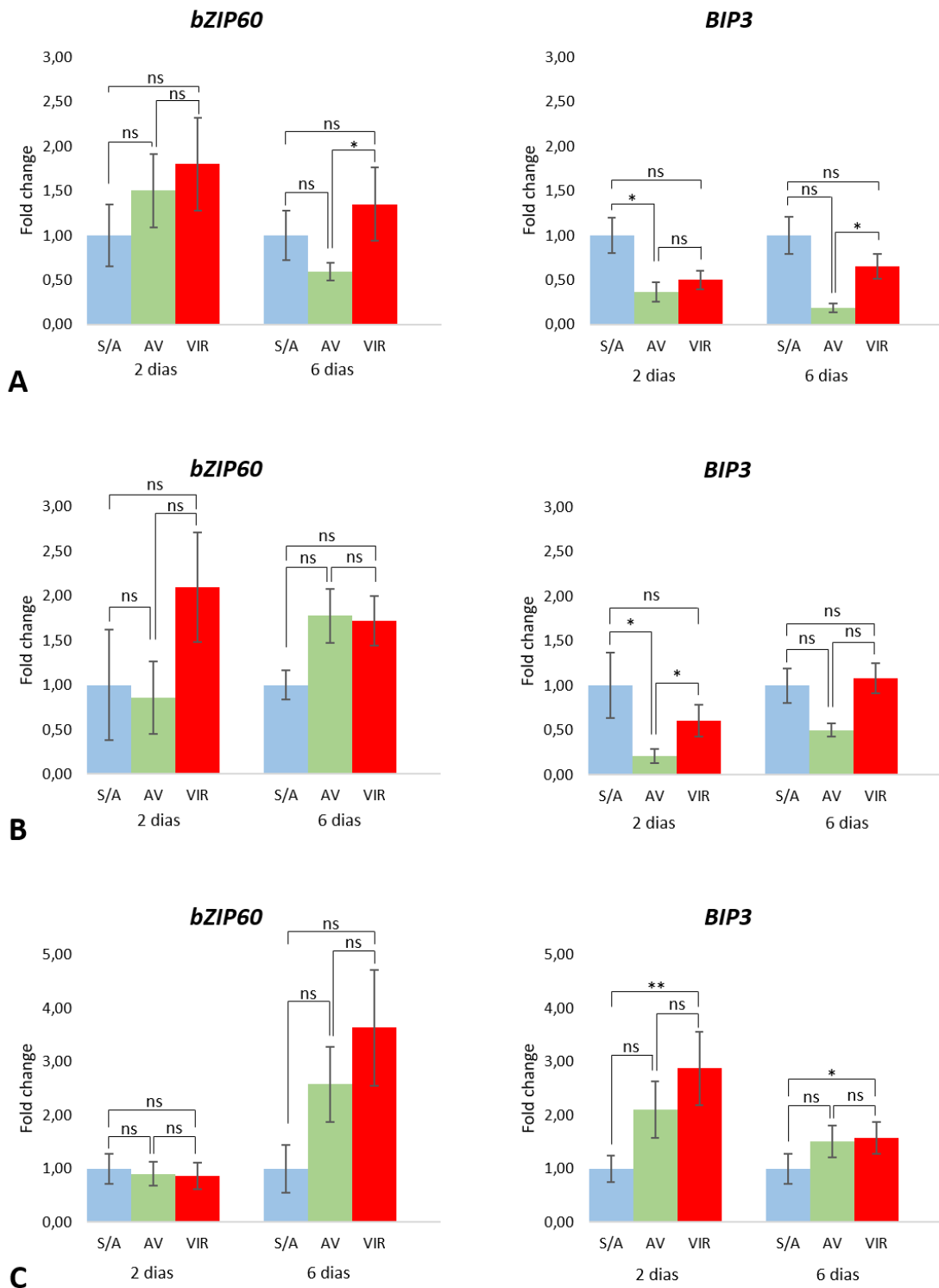


Figura 16 - Perfil de expressão dos genes *bZIP60* e *BIP3*, da via de resposta ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo endoplasmático (UPR) de *Arabidopsis thaliana* em resposta ao (A) PfGSV, (B) CoRSV e (C) CiCSV, em experimentos com tempo de acesso à inoculação de 2 e 6 dias. (S/A): plantas sem ácaros, (AV): plantas infestadas com ácaros avirulíferos e (VIR): plantas infestadas com ácaros virulíferos. Teste de Dunn's: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*  $p < 0,00005$  e ns - não significativo.

### 5.8. Transmissão mecânica de CiLV-C estirpe SJP e PfGSV para *N. benthamiana*

Para a confirmação da transmissão mecânica do CiLV-C e do PfGSV, mesmo



após o aparecimento de sintomas, foi realizada a detecção molecular dos vírus por PCR, aos 6 e 12 DAI, tendo sido avaliados três tratamentos para cada tempo: 1) plantas inoculadas com vírus e mantidas em temperatura ambiente (24-25°C), 2) plantas inoculadas com vírus e mantidas em alta temperatura (28-30°C) e 3) plantas controle, inoculadas somente com o tampão. Conforme esperado, não houve amplificação de fragmento específico de CiLV-C ou PfGSV nas plantas controle (FIGURAS 17 C e 18 C), enquanto foi confirmada a presença de vírus somente nas plantas inoculadas com vírus (FIGURAS 17 A/B e 18 A/B), sendo que em temperatura ambiente, somente plantas inoculadas com CiLV-C apresentaram fragmento viral, com eficiência de transmissão de 100% (FIGURAS 17 A/B).

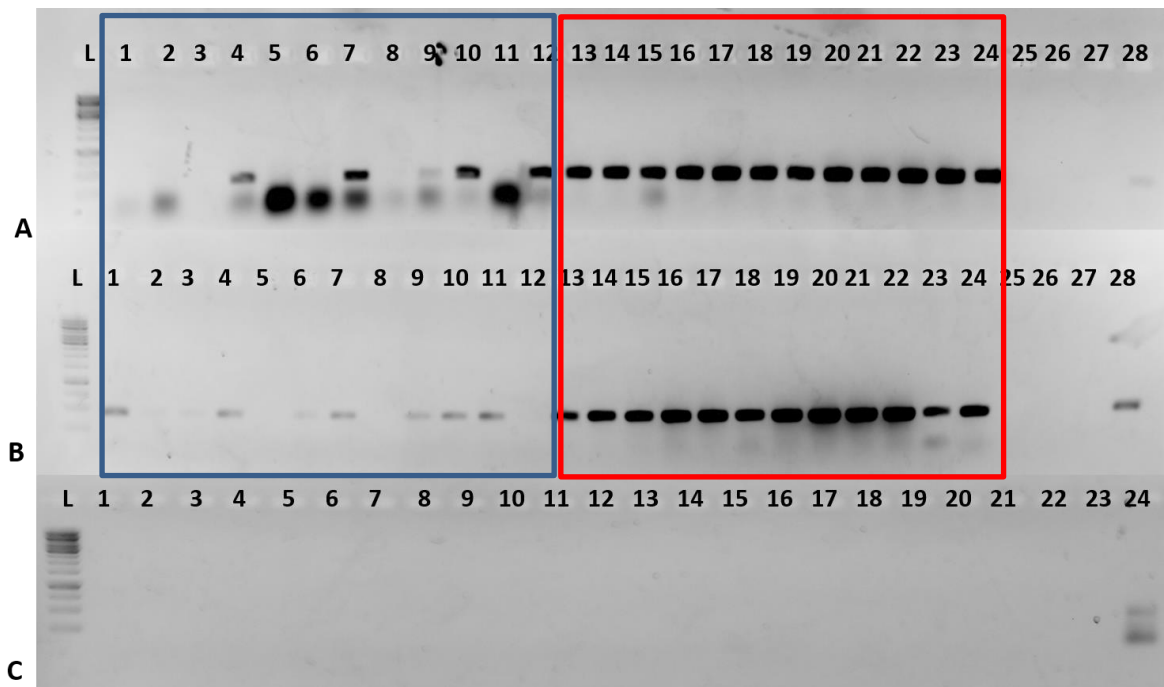


Figura 17 - Gel de agarose a 1% evidenciando o produto da amplificação por PCR para a detecção de CiLV-C em folhas de *N. benthamiana*, em experimento após 6 e 12 DAI: (A) folhas de *N. benthamiana* mantidas em alta temperatura (28 – 30°C) aos 6 DAI (1 a 12, delimitadas pelo quadro azul) e em temperatura ambiente (24 – 25°C) aos 6 DAI (13 a 24, delimitadas pelo quadro vermelho), Controle negativo da extração de RNA (planta sadia = 25), controle negativo cDNA (26), controle negativo PCR (27), controle positivo PCR (planta sintomática) (28); (B) folhas de *N. benthamiana* mantidas em alta temperatura aos 12 DAI (1 a 12, delimitadas pelo quadro azul) e em temperatura ambiente aos 12 DAI (13 a 24, delimitadas pelo quadro vermelho), Controle negativo da extração de RNA (planta sadia = 25), controle negativo cDNA (26), controle negativo PCR (27), controle positivo PCR (planta sintomática) (28); (C) folhas de *N. benthamiana* inoculadas somente com tampão (controle) aos 6 DAI em alta temperatura (1 a 5), aos 6 DAI em temperatura ambiente (6 a 10), aos 12 DAI em alta temperatura (11 a 15) e aos 12 DAI em temperatura ambiente (16 a 20), Controle negativo da extração de RNA (planta sadia = 21), controle negativo cDNA (22), controle negativo PCR (23), controle positivo PCR (planta sintomática) (24). (L) Marcador de peso molecular 1 kb (Thermo Scientific – SM0311). Amplicon CiLV-C: 393 pb.

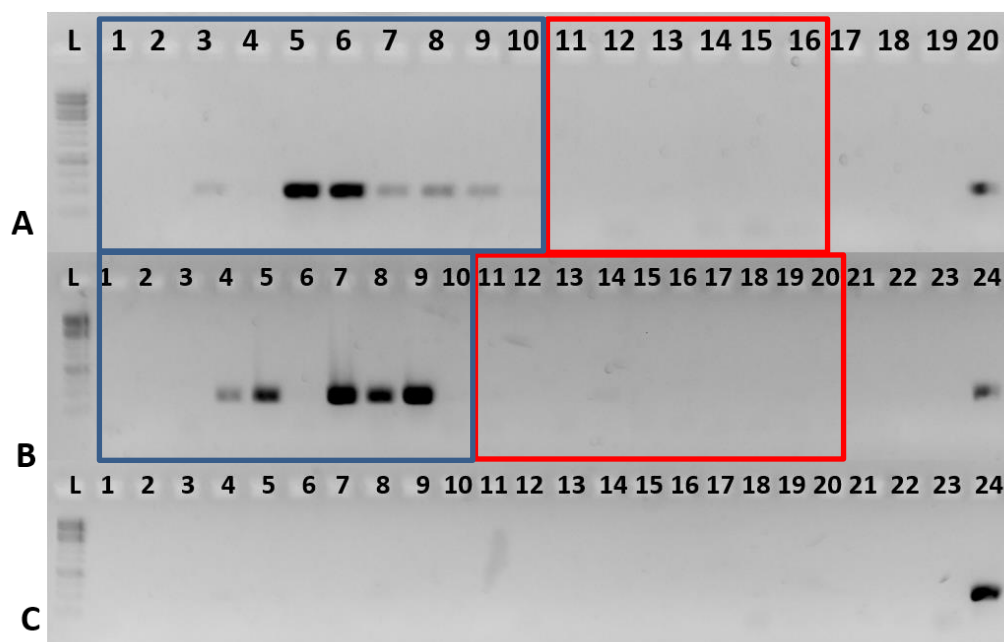


Figura 18 - Gel de agarose a 1% evidenciando o produto da amplificação por RT-PCR para a detecção de PfGSV em folhas de *N. benthamiana*, em experimento após 6 e 12 DAI: (A) folhas de *N. benthamiana* mantidas em alta temperatura (28 – 30°C) aos 6 DAI (1 a 10, delimitadas pelo quadro azul) e em temperatura ambiente (24 – 25°C) aos 6 DAI (11 a 16, delimitadas pelo quadro vermelho), Controle negativo da extração de RNA (planta sadia = 17), controle negativo cDNA (18), controle negativo PCR (19), controle positivo PCR (planta sintomática) (20); (B) folhas de *N. benthamiana* mantidas em alta temperatura aos 12 DAI (1 a 10, delimitadas pelo quadro azul) e em temperatura ambiente aos 12 DAI (11 a 20, delimitadas pelo quadro vermelho), Controle negativo da extração de RNA (planta sadia = 21), controle negativo cDNA (22), controle negativo PCR (23), controle positivo PCR (planta sintomática) (24); (C) folhas de *N. benthamiana* inoculadas somente com tampão (controle) aos 6 DAI em alta temperatura (1 a 5), aos 6 DAI em temperatura ambiente (6 a 10), aos 12 DAI em alta temperatura (11 a 15) e aos 12 DAI em temperatura ambiente (16 a 20), Controle negativo da extração de RNA (planta sadia = 21), controle negativo cDNA (22), controle negativo PCR (23), controle positivo PCR (planta sintomática) (24). (L) Marcador de peso molecular 1 kb (Thermo Scientific – SM0311). Amplicon PfGSV: 443 pb.

### 5.9. Avaliação da expressão gênica de *N. benthamiana*, em resposta ao CiLV-C e em diferentes temperaturas

Avaliando a resposta de *N. benthamiana* ao cilevírus CiLV-C, foi possível detectar que a expressão de genes das vias do SA, UPR, e associados à HR (FIGURAS 19 A/B/C), foi induzida em plantas mantidas em temperatura alta, quando comparadas com aquelas mantidas em temperatura ambiente. A expressão dos genes *PR2* e *bZIP60* foi reprimida em plantas mantidas em temperatura ambiente, quando comparadas às plantas controle para cada temperatura (FIGURAS 19 A/C).

As plantas controle, tanto as mantidas em temperatura ambiente, quanto as mantidas em alta temperatura, apresentam valores de *fold change* igual a 1. Com isso, para melhor visualização, foi utilizado somente um tratamento controle nos gráficos de expressão gênica (FIGURA 19).

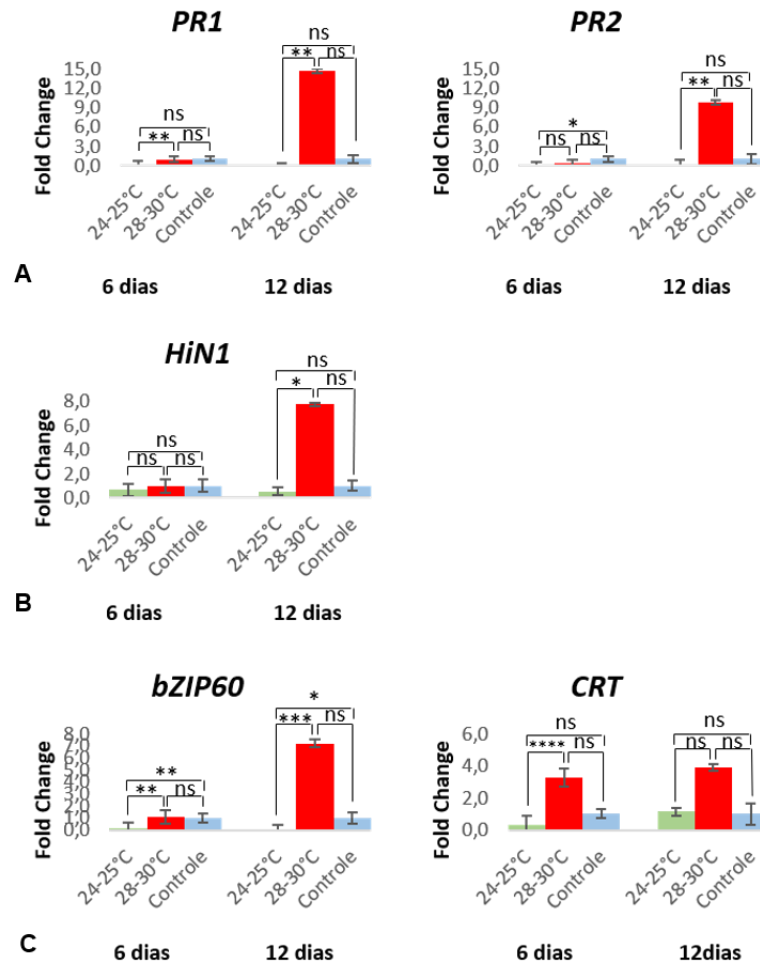


Figura 19 - Perfil de expressão dos genes: (A) via do SA; (B) associado à HR; (C) envolvidos em acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo endoplasmático (UPR) de *N. benthamiana* em resposta ao CiLV-C, aos 6 e 12 dias após inoculação mecânica. Teste de Dunn's: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*  $p < 0,00005$  e ns - não significativo.

A resposta de *N. benthamiana* ao CiLV-C evidenciou que há maior indução de defesa vegetal quando a planta é mantida em temperatura elevada. Todos os genes avaliados das diferentes vias (*PR1*, *PR2*, *HiN1*, *bZIP60* e *CRT*) foram diferencialmente induzidos, aos 6 e/ou 12 dias após a inoculação mecânica, quando plantas mantidas sob temperatura 28-30°C foram quando comparadas com aquelas mantidas sob temperatura ambiente (FIGURA 19).

## 6. DISCUSSÃO

Sabe-se que as principais vias hormonais de resposta de plantas a agentes bióticos são a do JA, induzida principalmente em resposta ao ataque de herbívoros e patógenos necrotróficos e a do SA, a principal via de resposta de plantas a patógenos biotróficos, como vírus e, em alguns casos, a insetos e ácaros, ainda que de maneira menos evidente (PIETERSE

et al., 2012; ARENA et al., 2016; 2018; 2020; LI et al., 2020; YE et al., 2020).

O presente trabalho avaliou a resposta de *A. thaliana* a *B. yothersi* avirulífero e *B. yothersi* virulífero para PfGSV, CoRSV e CICSV. O desafio com *B. yothersi* avirulífero foi realizado em três ensaios independentes, pois este tratamento serviu como controle da infestação com ácaros virulíferos tanto para o cilevírus (ensaio 1) quanto para os dichorhavirus (ensaios 2 e 3). A diferença de expressão encontrada entre os ensaios, nas plantas infestadas com ácaros AV, pode ser explicada pela ativação de efetores das diferentes hospedeiras (DOU; ZHOU, 2012; DALIO et al., 2017).

Em relação a estudos com ácaros, há um número elevado de artigos científicos sobre a resposta molecular de hospedeiras vegetais a ácaros *Tetranychus* sp. (SANTAMARIA et al., 2020; BAKR et al., 2020; PULGA et al., 2020), em que tanto a via do JA quanto a do SA são induzidas em plantas de agrião, tomateiro, citros e pimenta, infestadas por ácaros. Embora JA e SA sejam considerados fitormônios antagonistas, SA não parece antagonizar as respostas de JA no contexto planta-ácaro, uma vez que o conteúdo de SA também aumenta após o ataque do ácaro. No entanto, os únicos estudos disponíveis em resposta a ácaros *Brevipalpus* são os de Arena et al. (2016, 2018, 2020). Estes trabalhos evidenciam uma clara indução dos genes da via do JA e SA em resposta ao vetor, além da expressão aumentada de genes envolvidos em HR e morte celular (ARENA et al., 2016, 2018, 2020). Os autores evidenciaram que, enquanto a via do JA parece ser efetiva contra o *B. yothersi*, a concentração aumentada de SA beneficia o desenvolvimento do ácaro através da maior oviposição (ARENA et al., 2016, 2018), diferentemente do observado na interação entre tomateiro e ácaros *Tetranychus urticae* (VILLARROEL et al., 2016), e entre tomateiros e mosca branca (LI et al., 2019; PAN et al., 2021), que são prejudicados pela indução da via do SA. No geral, nossos resultados evidenciaram que os dichorhavirus amplificam a resposta de SA e, em contrapartida, reduzem a resposta de JA (FIGURAS 13 e 14), indicando que, assim como em trabalhos de Arena et al. (2016; 2020) envolvendo CiLV-C, há o cross-talk (antagonismo) entre as vias de SA e JA nas plantas infectadas com esses VTBs.

Ainda, nossos resultados sugerem que tanto para cilevírus, quanto para dichorhavirus houve indução de genes para as quatro vias de respostas avaliadas (FIGURAS 13, 14, 15 e 16). Os resultados apresentaram alguma divergência entre os tempos de coleta e o vírus avaliado, o que pode ser explicado pela dificuldade na homogeneidade das repetições nos tratamentos, uma vez que foi observado por PCR diferentes intensidades de fragmentos virais entre amostras em um mesmo experimento. Pode ser possível que, em algumas folhas, nem todos os ácaros tenham se alimentado pelo estresse que sofrem durante o processo de

transferência das hospedeiras originais para *A. thaliana*, como relatado por DE LILO et al. (2021), ou pela quantidade viral adquirida.

Genes relacionados a UPR vem sendo recentemente estudados em resposta a fitovírus e não há informações sobre resposta desses genes frente à infecção por cilevírus e/ou dichorhavírus. Os resultados aqui apresentados indicam que tanto cilevírus quanto dichorhavírus induziram essa via de resposta (FIGURA 16).

Entre os dichorhavírus CoRSV e CICSV a expressão de genes da via do SA, do JA, de UPR e associados à HR foram induzidos logo aos 2 DAI (FIGURAS 13 B/C, 14 B/C, 15 B/C e 16 B/C), diferentemente da expressão observada em resposta à inoculação do cilevírus PfGSV, cuja maior expressão se deu somente aos 6 DAI (FIGURAS 13 A, 14 A, 15 A e 16 A). Dados similares foram encontrados por Arena et al. (2016, 2020), que também relataram aumento na expressão desses genes em *A. thaliana* em resposta a outro cilevírus, o CiLV-C ao longo do tempo (*time course*), antes mesmo do aparecimento de sintomas. Esses evidenciam que a planta responde mais rapidamente à infecção por dichorhavírus do que para cilevírus.

Assim, os dados obtidos neste trabalho sugerem que as vias de defesa da planta são ativadas na presença tanto do cilevírus PfGSV quanto na dos dichorhavírus CoRSV e CICSV de maneira similar – mas não idêntica – ao observado para o CiLV-C. A indução da via do SA é considerada um padrão para todos os fitovírus, incluindo os VTBs, e isso foi claramente evidenciado pelo marcador principal da via, o gene *PRI*. Por outro lado, a via do JA está associada à resposta a herbívoros e, como esperado, foi induzida na presença de ácaros avirulíferos. No entanto, no geral, os níveis de expressão dos genes dessa via foram bem menores nos tratamentos com ácaros VIR, sendo essa observação mais evidente em resposta aos dichorhavírus do que ao cilevírus avaliado. Já os genes associados a HR foram induzidos principalmente na presença do PfGSV, evidenciando uma resposta diferencial da planta a vírus dos dois gêneros avaliados. Os resultados obtidos não deixam dúvidas de que diferentes vias de defesa da planta são ativadas pelo ácaro vetor e pelos VTBs estudados, sendo que aparentemente a resposta é mais rápida à presença dos dichorhavírus do que aos cilevírus.

O experimento de inoculação mecânica evidenciou nítida diferença na eficiência de transmissão do PfGSV, sendo que apenas em temperaturas elevadas foi possível detectar a presença do vírus nas plantas inoculadas. Nenhuma das plantas inoculadas e mantidas a temperatura de 24-25°C apresentaram bandas correspondentes ao vírus em RT-PCR. É interessante notar que o maracujazeiro é nativo de regiões tropicais, tendo provavelmente evoluído com o PfGSV nessas condições. Ademais, todos os relatos de mancha verde do maracujazeiro são de regiões com elevadas temperaturas (Ramos-González et al., 2021). Por

outro lado, foi observada 100% de eficiência de transmissão do CiLV-C, independentemente da temperatura à qual as plantas foram mantidas. Já a resposta molecular das plantas a esse vírus foi bastante distinta em função da temperatura estudada. Aos 6 e 12 DAI praticamente não houve indução na expressão dos genes marcadores das vias do SA, JA, UPR, e associados à HR, em plantas inoculadas a 24-25°C quando comparadas aos controles não inoculados. Por outro lado, foi observada clara indução na expressão de todos os genes avaliados, em plantas inoculadas com CiLV-C mantidas em alta temperatura, aos 12 DAI, sendo que em alguns casos essa diferença já foi observada aos 6 DAI. Isso evidencia um claro papel da temperatura na resposta vegetal ao CiLV-C e, provavelmente, a outros VTBs, o que demonstra que o componente ambiental não pode ser menosprezado e, portanto, deve ser incluído nos estudos de interações vírus-planta-vetor.

## 7. CONCLUSÃO

Ensaio que avaliaram a resposta de *A. thaliana* à infestação por *B. yothersi* avirulíferos ou virulíferos para os dichorhavirus CoRSV e CICSV e para o cilevírus PfGSV indicaram que as vias de defesa da planta são ativadas frente aos ácaros e aos VTBs. Enquanto o ácaro induziu claramente a resposta da via do JA, os três vírus testados ativaram a via do SA; PfGSV e CoRSV ativaram genes envolvidos na HR e na via de UPR.

A resposta de *N. benthamiana* ao CiLV-C evidenciou que a temperatura pode interferir diretamente na resposta vegetal frente ao vírus, tendo havido maior indução de genes em plantas mantidas sob temperatura elevada, com aparecimento de sintomas seis dias antes daquelas mantidas em temperatura ambiente.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARASINGHE, G.K. et al. Taxonomy of the Order Mononegavirales: update 2019. **Arch. Virol.**, 164 (7): 1967-1980, 2019.

ANTONIOLI-LUIZON, R. **Sequenciamento parcial do vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus-PFGSV), desenvolvimento de métodos para sua detecção e estudos sobre sua variabilidade genética.** 2009. 70 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura – Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

ARENA, G.D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; NUNES, M.A.; RIBEIRO-ALVES, M.; CAMARGO, L.E.A.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus

leprosis virus C Infection Results in Hypersensitive-Like Response, Suppression of the JA/ET Plant Defense Pathway and Promotion of the Colonization of Its Mite Vector. **Front. Plant Sci.** 7:1757. doi: 10.3389/fpls. 2016.

ARENA, G.D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; NUNES, M.A.; JESUS, C.C.; CALEGARIO, R.F.; KITAJIMA, E.W.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J. *Arabidopsis thaliana* as a model host for *Brevipalpus* mite-transmitted viruses. **Sci. Agric.**, v. 74, n. 1, p. 85-89, 2017.

ARENA, G. D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; ROGERIO, L. A.; RIBEIRO-ALVES, M.; CASTEEL, C. L.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M. A. Making a Better Home: Modulation of Plant Defensive Response by *Brevipalpus* Mites. **Front. Plant Sci.** doi:10.3389/fpls.2018.01147. 2018.

ARENA, G. D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; FALK, B. W.; CASTEEL, C. L.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M. A. Plant Immune System Activation Upon Citrus Leprosis Virus C Infection Is Mimicked by the Ectopic Expression of the P61 Viral Protein. **Front. Plant Sci.**, 11. doi:10.3389/fpls.2020.01188. 2020.

ARENA, G. D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; TASSI, A. D. et al. A TaqMan RT-qPCR assay for absolute quantification of citrus leprosis virus C lineage SJP: disclosing the subgenomic/genomic ratio in plant and mite vector, plant organ-specific viral loads, and the kinetics of viral accumulation in plants. **Trop. Plant Pathol.** doi.org/10.1007/s40858-022-00539-4. 2022.

BAKR, A.A.; REZK, H.A.; SALEH, S.M.; EL-MORSHEDEY, N.H. Significance of foliar sprayed salicylic acid in kidney bean resistance against *Tetranychus urticae* (Trombidiformes: Tetranychidae) attack. **Persian J. Acarol.**, v. 9, n.2, p. 193-205. 2020.

BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.M.; KITAJIMA, E.W.; KUBO, K.S.; BASSANEZI, R.B.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus Leprosis: Centennial of an Unusual Mite – Virus Pathosystem. **Plant Dis.**, v. 94, n. 3, p. 284-292, 2010.

BEARD, J.J.; OCHOA, R.; BRASWELL, W.E.; BAUCHAN, G.R. *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) species complex (Acari: Tenuipalpidae) – a closer look. **Zootaxa** 3944(1): 001-067, 2015.

BISCHOFF, V.; COOKSON, S.J.; WU, S.; SCHEIBLE, W.R. Thaxtomin A affects CESA complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **J. Exp. Bot.** 60, 955–65. doi:10.1093/jxb/ern344, 2009.

BLANCO-HERRERA et al. The UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase (UGGT), a key enzyme in ER quality control, plays a significant role in plant growth as well as biotic and abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biol.** 15, 127. doi: https://doi.org/10.1186/s12870-015-0525-2, 2015.

BOARI, A.J.; FREITAS-ASTÚA, J.; FERREIRA, P.T.O.; NEDER, D.G.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L.; KITAJIMA, E.W. Purification and serology of the Coffee ringspot virus. **Summa Phytopathol.**, v. 30, n. 4, p 453-458, 2004.

BOUDSOCQ, M.; WILLMANN, M.R.; MCCORMACK, M.; LEE, H.; SHAN, L.; HE, P., et al. Differential innate immune signaling via Ca(2+) sensor protein kinases. **Nature** 464, 418–22. doi:10.1038/nature08794, 2010.

CHABI-JESUS, C.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; TASSI, A.D.; GUERRA-PERAZA, O.; KITAJIMA, E.W.; HARAKAVA, R.; BESERRA JR, E.A.; SALAROLI, R.B.; FREITAS-ASTÚA, J. Identification and characterization of citrus chlorotic spot virus, a new dichorhavirus associated with citrus leprosis-like symptoms. **Plant Dis.** <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1425-RE>, v. 102, n. 8, p. 1588-1598, 2018.

CHABI-JESUS et al. Molecular Epidemiology of Citrus Leprosis Virus C: A New Viral Lineage and Phylodynamic of the Main Viral Subpopulations in the Americas. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 1-18, 2021

CHEN, H.; XUE, L.; CHINTAMANANI, S.; GERMAIN, H.; LIN, H.; CUI, H., et al. Ethylene insensitive and ethylene insensitive-like1 repress salicylic acid induction deficient expression to negatively regulate plant innate immunity in Arabidopsis. **Plant Cell** 21, 2527–40. doi:10.1105/tpc.108.065193, 2009.

CRUZ-JARAMILLO et al. Characterization of a Proposed *Dichorhavirus* Associated with the Citrus Leprosis Disease and Analysis of the Host Response. **Viruses**, v.6, p. 2602-2622. doi: <https://doi.org/10.3390/v6072602>. 2014.

CROY, J. R.; ACOSTA, N. C.; MOONEY, K. A. Regulating plant herbivore defense pathways in the face of attacker diversity. **New Phyt.**, v. 231, p. 2110-2112, 2021.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M. K. Genome wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization. **Plant Physiol**, v. 139, p. 5–17. doi: 10.1104/pp.105.063743, 2005.

DALIO et al. PAMPs, PRRs, effectors and R-genes associated with citrus-pathogen interactions. **Annals of Botany.**, v. 119, p. 749-774. 2017.

DE LILLO, E.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; SIMONI, S.; TASSI, A.D.; VALENZANO, D. Phytophagous mites transmitting plant viruses: update and perspectives. **Entomol. Gen.**, v. 41, n. 5, p. 439-462. doi: 10.1127/entomologia/2021/1283. 2021.

DIETZGEN, R.G.; KUHN, J.H.; CLAWSON, A.N.; FREITAS-ASTÚA, J.; GOODIN, M.M.; KITAJIMA, E.W.; KONDO, H.; WETZEL, T.; WHITFIELD, A.E. *Dichorhavirus* – a proposed new genus for *Brevipalpus* mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. **Arch. Virol.**, New York, v. 159, p. 607-619, 2014.

DIETZGEN, R.G.; FREITAS-ASTÚA, J.; CHABI-JESUS, C.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; GOODIN, M.M.; KONDO, H.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W. Dichorhaviruses in their Host Plants and Mite Vectors. **Adv. Virus Res.**, v. 102, p. 119-148, 2018.

DOU, D.; ZHOU, J-M. Phytopathogen Effectors Subverting Host Immunity: Different Foes, Similar Battleground. **Cell Host Microbe**, v. 12, p. 484-495. 2012.



FREITAS-ASTÚA, J.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; ARENA, G.D.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W. *Brevipalpus*-transmitted viruses: parallelism beyond a common vector or convergent evolution of distantly related pathogens? **Curr. Opin. Virol.**, v. 33, p. 66-73, 2018.

GOODIN, M.; DOS REIS FIGUEIRA, A. Good to the last drop: The emergence of coffee ringspot virus. **PLoS Pathog.**, 15(1): e1007462. 2019.

HICKMAN et al. Architecture and Dynamics of the Jasmonic Acid Gene Regulatory Network. **Plant Cell**, v. 29, p. 2086-2105, 2017.

IWATA, Y.; FEDOROFF, N. V.; KOIZUMI, N. Arabidopsis bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. **Plant Cell**, 20 (11): 3107-21, 2008.

KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, C.V. *Brevipalpus* - transmitted plant virus and virus like diseases: cytopathology and reports of some recent cases. **Exp. Appl. Acarol.**, Dordrecht, v. 30, n.1-3, p. 135-160, 2003a.

KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; RODRIGUES, J.C.V. Passion fruit green spot virus vectored by *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). **Exp. Appl. Acarol.**, v. 30, n. 1, p. 225-231, 2003b.

KITAJIMA, E.W.; KUBO, K.S.; FERREIRA, P.T.O.; ALCÂNTARA, P.K.; BOARI, A.J.; GOMES, R.T.; FREITAS-ASTUA, J.; REZENDE, J.A.M.; DE MORAIS, G.J.; SALAROLI, R.B. Chlorotic spots on *Clerodendrum*, a disease caused by a nuclear type of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) transmitted virus. **Sci. Agric.**, v. 65, n. 1, p. 36- 49, 2008.

KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V.; FREITAS-ASTÚA, J. An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite-transmitted viruses. **Sci. Agric.** 67(3): 348-371, 2010.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; BRAGHINI, M.T.; FAZUOLI, L.C.; LOCALI-FABRIS, E.C.; SALAROLI, R.B. Natural infection of several *Coffea* species and hybrids and *Psilanthus ebracteolatus* by the coffee ringspot virus (CoRSV). **Sci. Agric.** vol.68, n.4, p.503-507. ISSN 1678-992X, 2011.

KITAJIMA, E.W.; ALBERTI, G. Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae)—economically important plant-virus vectors. Part 7. Ultrastructural detection of cytoplasmic and nuclear types of *Brevipalpus*-transmitted viruses. **Zool.**, 160:173–192, 2014.

KITAJIMA, E.W.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; FREITAS-ASTÚA, J.; TASSI, A.D. The peculiar pathosystem of the *Brevipalpus* (Tenuipalpidae) mite-transmitted plant viruses. **Atti dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia Anno LXVIII**, 2020: 183-188. 2021.

KUBO, K. S., NOVELLI, V. M., BASTIANEL, M., LOCALI-FABRIS, E. C., ANTONIOLI-LUIZON, R., MACHADO, M. A.; FREITAS-ASTÚA, J. Detection of *Brevipalpus* transmitted viruses in their mite vectors by RT–PCR. **Exp. Appl. Acarol.**, v.54, n.1, p.33–39, 2011.

KUHN, J. et al. Taxonomic update of phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. **Arch. Virol.** doi:10.1007/s00705-021-05143-6. 2021.

KUHN, J. et al. Taxonomic update of phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. **Arch. Virol.** doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05546-z>. 2022.

LEÃO, T. L. **Indução do estresse do retículo endoplasmático celular pelo *Vaccinia Virus*: modulação da via UPR durante a infecção viral.** 2013. 98 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

LI, W.; XU, Y.-P.; ZHANG, Z.-X.; CAO, W.-Y.; LI, F.; ZHOU, X., et al. Identification of genes required for nonhost resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals novel signaling components. **PLoS One** 7, e42796. doi:10.1371/journal.pone.0042796, 2012.

LI, W.; YADETA, K. A.; ELMORE, J. M.; COAKER, G. The *Pseudomonas syringae* effector HopQ1 promotes bacterial virulence and interacts with tomato 14-3-3 proteins in a phosphorylation-dependent manner. **Plant Physiol.**, v. 161, p. 2062–2074. doi: 10.1104/pp.112.211748. 2013.

LI et al. Viral infection-induced endoplasmic reticulum stress and a membrane-associated transcription factor NbNAC089 are involved in resistance to virus in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Pathol.**, v. 67, p. 233-243. doi: 10.1111/PPA. 2018.

LI, P.; LIU, C.; DENG, W. H.; YAO, D. M.; PAN, L. L.; LI, Y. Q.; LIU, Y. Q.; LIANG, Y.; ZHOU, X. P.; WANG, X. W. Plant begomoviruses subvert ubiquitination to suppress plant defenses against insect vectors. **PLoS Pathogens**, v. 15: e1007607, 2019.

LI, D.; HALITSCHKE, R.; BALDWIN, I.T.; GAQUEREL. Information theory tests critical predictions of plant defense theory for specialized metabolism. **Sci. Adv.**, v. 6. 2020.

LILLY, S. T.; DRUMMOND, R. S. M.; PEARSON, M. N.; MACDIARMID, R. M. Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virus infected *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Plant. Microbe. Interact**, v. 24, p. 294–304. doi:10.1094/MPMI-10-10-0236, 2011.

LINDERMAYR, C.; SELL, S.; MÜLLER, B.; LEISTER, D.; DURNER, J. Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. **Plant Cell** 22, 2894–907. doi:10.1105/tpc.109.066464, 2010.

LIU et al. Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. **PLoS One**, v.7. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046451>. 2012.

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. **J. Gen. Virol.**, v. 87, p. 2721-2729, 2006.

- LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A. Genus *Cileivirus*. In: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B. & Lefkowitz, E.J. (Eds). Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses. San Diego: **Elsevier**, p. 1139-1142, 2012.
- LÓPEZ, A.; RAMÍREZ, V.; GARCÍA-ANDRADE, J.; FLORS, V.; VERA, P. The RNA silencing enzyme RNA polymerase V is required for plant immunity. **PLoS Genet.** 7, e1002434. doi:10.1371/journal.pgen.1002434, 2011.
- MELZER et al. A cilevirus infects ornamental hibiscus in Hawaii. **Arch. Virol.**, v. 158, p. 1-4. 2013.
- MOREIRA et al. Impact of diseases and pests on premature fruit drop in sweet orange orchards in São Paulo state citrus belt, Brazil. **Pest Manag. Sci.**, v. 78, p. 2643-2656, 2022.
- MOON et al. Endoplasmic reticulum stress responses function in the HRT-mediated hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana*. **Mol. Plant Pathol.**, v. 67, p. 1382. doi: 10.1111/MPP.12369. 2016.
- NAVIA, D., NOVELLI, V.M., ROMBAUTS, S., FREITAS-ASTÚA, J., MENDONÇA, R.S., NUNES, M.A., MACHADO, M.A., LIN, Y-C, LE, PHUONG, ZHANG, Z., GRBIC, M., WYBOUW, N., BREEUWER, J.A.J., VAN LEEUWEN, T., GRBIC, M., VAN DE PEER, Y. Draft genome assembly of the false spider mite *Brevipalpus yothersi*. **Microbiol. Resour. Announc.**, 8:e01563-18, 2019.
- OLMEDO-VELARDE, A.; HU, J.; MELZER, M. J. A Virus Infecting *Hibiscus rosa-sinensis* Represents an Evolutionary Link Between Cileviruses and Higreviruses. **Front. Microbiol.**, v. 12, p. 988, 2021.
- PAN, L-L.; MIAO, H.; WANG, Q.; WALLING, L. L.; LIU, S-S. Virus-induced phytohormone dynamics and their effects on plant–insect interactions. **New Phytol.**, v. 230, p. 1305-1320, 2021.
- PIETERSE, C. M.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C.; LEON-REYES, A.; VAN WEES, S. C. Hormonal modulation of plant immunity. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 28, p. 489–521. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055, 2012.
- PULGA, P.S.; HENSCHER, J.M.; RESENDE, J.T.V.; ZEIST, A.R.; MOREIRA, A.F.P.; GABRIEL, A.; SILVA, M.B.; GONÇALVES, L.S.A. 2020. Salicylic acid treatments induce resistance to *Tuta absoluta* and *Tetranychus urticae* on tomato plants. **Hortic. Bras.**, v. 38, p. 288-294. doi:10.1590/S0102-053620200308. 2020.
- RAMALHO, T.O.; FIGUEIRA, A.R.; WANG, R.; JONES, O.; HARRIS, L.E.; GOODIN, M.M. Detection and survey of coffee ringspot virus in Brazil. **Arch. Virol.**, v. 160, p. 1-9, 2016.
- RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; GUERRA-PERAZA, O.; BRETON, M.C.; ARENA, G.D.; NUNES, M.A.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Phylogenetic and Molecular Variability Studies Reveal a New Genetic Clade of Citrus

leprosis virus C. **Viruses**, v. 8, n. 6. doi:10.3390/v8060153. 2016.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; GUERRA-PERAZA, O.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W.; HARAKAVA, R.; SALAROLI, R.B.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus leprosis virus N: a new dichorhavirus causing citrus leprosis disease. **Phytopathol.**, v. 107, n. 8, p. 963-976, 2017.

RAMOS-GONZÁLEZ et al. Unveiling the complete genome sequence of clerodendrum chlorotic spot virus, a putative dichorhavirus infecting ornamental plants. **Arch. Virol.**, v. s/n, p. s/n, 2018.

RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; SANTOS, G. F.; CHABI-JESUS, C.; HARAKAVA, R.; KITAJIMA, E. W.; FREITAS-ASTÚA, J. Passion fruit green spot virus genome harbors a new orphan ORF and highlights the flexibility of the 5'-End of the RNA2 segment across Cileviruses. **Front. Microbiol.**, v. 11, n. 206. doi: 10.3389/fmicb.2020.00206. 2020a.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; FREITAS-ASTÚA, J. Create one new species in the genus *Cilevirus* (Martellivirales: Kitaviridae). Disponível em: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=202009287](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=202009287). 2020b.

RAMOS-GONZÁLEZ et al. Poorly Conserved P15 Proteins of Cileviruses Retain Elements of Common Ancestry and Putative Functionality: A Theoretical Assessment on the Evolution of Cilevirus Genomes. **Front. Plant Sci.**, v. 12, p. 1-17, 2021.

RAMOS-GONZÁLEZ et al. A Novel Lineage of Cile-Like Viruses Discloses the Phylogenetic Continuum Across the Family Kitaviridae. **Front. Microbiol.**, v. 13, p. 1-22, 2022.

RODRIGUES, V.; BASTIANEL, M.; KUBO, K.; FADEL, A.L.; NICOLINI, F.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J. Desenvolvimento de um método para a otimização da transmissão experimental do vírus da leprose dos citros. **Laranja** 28(1): 29-38, 2007.

RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C. *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae): vectors of invasive, non-systemic cytoplasmic and nuclear viruses in plants. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 59, p. 165-175, 2013.

ROY, A.; LEON, M.G.; STONE, A.L.; SCHNEIDER, W.L.; HARTUNG, J.; BRLANSKY, R.H. First report of *Citrus leprosis virus* nuclear type in sweet orange in Colombia. **Plant Dis.**, v. 98, n. 8, p. 28-98, 2014.

ROY, A. et al. Identification and molecular characterization of nuclear *Citrus leprosis virus*, a member of the proposed *Dichorhavirus* genus infecting multiple *Citrus* species in Mexico. **Phytopathol.**, v. 105, p. 564-575. doi:10.1094/PHYTO-09-14-0245-R. 2015.

ROY et al. A Novel Virus of the Genus *Cilevirus* Causing Symptoms Similar to Citrus Leprosis. **Viology**. doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-12-0177-R>. 2013.

ROY, A.L.; STONE, A.L.; LEÓN MARTÍNEZ, G.; HARTUNG, J.S.; WEI, G.;

MAVRODIEVA, V.A.; NAKHLA, M.K.; SCHNEIDER, W.L.; BRLANSKY, R.H. First Report of Hibiscus-infecting cilevirus in *Citrus sinensis* in Meta and Casanare, Colombia. **Plant Dis.**, v. 102, n. 8, p. 1675-1675, 2018.

SANTAMARIA, M.E. et al. 2020. Plant Defenses Against *Tetranychus urticae*: Mind the Gaps. **Plants**, v. 9, n. 464. doi:10.3390/plants9040464. 2020.

TASSI, A.D.; GARITA-SALAZAR, L.C.; AMORIM, L.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W. Virus-vector relationship in the Citrus leprosis pathosystem. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 71, p. 227–241, 2017.

TASSI, A. **Diversidade morfológica e genética de diferentes espécies de *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) e suas competências como vetoras de vírus.** 2018. 263 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura —Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

VILLARROEL, C.A. et al. 2016. Salivary proteins of spider mites suppress defenses in *Nicotiana benthamiana* and promote mite reproduction. **Plant J.**, v. 86, p. 119-131. doi: 10.1111/tpj.13152. 2016.

VON SAINT PAUL, V.; ZHANG, W.; KANAWATI, B.; GEIST, B.; FAUS-KESSLER, T.; SCHMITT-KOPPLIN, P., et al. The *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. **Plant Cell** 23, 4124–45. doi:10.1105/tpc.111.088443, 2011.

WU, J.; BALDWIN, I. T. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 44, p. 1–24, 2010.

YAN W.; PRUITT, R. N.; NURNBERGER, T.; WANG, Y. Evasion of plant immunity by microbial pathogens. **Nature Reviews Microbiol.**, v. 20, p. 449-464, 2022.

YE, J.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; WU, X.; FANG, R. Plant Defense Networks against Insect-Borne Pathogens. **Trends Plant Sci.**, v. 26, p. 272-287. doi:10.1016/j.tplants.2020.10.009, 2020.

ZHAO, S.; FERNALD, R.D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **J. Comput. Biol.**, New York, v. 12, n. 8, p. 1045-1062, 2005.

ZURBRIGGEN, M. D.; CARRILLO, N.; HAJIREZAEI, M-R. ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for?. **J. Biotec.**, v. 160, n. 1, p. 80-90, 2010.